



**Universidad Autónoma de Madrid**

**Facultad de Medicina**

Departamento de Cirugía

Tesis Doctoral:

**POSIBILIDADES DE LA TERAPIA CELULAR EN EL  
DAÑO CEREBRAL TRAUMÁTICO**

Trabajo realizado para optar al grado de Doctor por:

Celia Bonilla Horcajo

**Directores:**

Dra. Mercedes Zurita Castillo

Prof. Jesús Vaquero Crespo



Los abajo firmantes, la **Dra. Mercedes Zurita Castillo**, Investigadora del Instituto de Salud Carlos III, y el **Prof. Jesús Vaquero Crespo**, Catedrático de Cirugía de la Universidad Autónoma de Madrid,

Hacen constar:

Que **Celia Bonilla Horcajo** ha realizado bajo su dirección el trabajo que lleva por título; **POSIBILIDADES DE LA TERAPIA CELULAR EN EL DAÑO CEREBRAL TRAUMÁTICO**, reuniendo, a su juicio, dicho trabajo, todos los requisitos formales y metodológicos para ser presentado Tesis doctoral

En Madrid, a 15 de Noviembre de 2011

Dra. Mercedes Zurita Castillo

Prof. Jesús Vaquero Crespo

**A mi familia**

# **POSIBILIDADES DE LA TERAPIA CELULAR EN EL DAÑO CEREBRAL TRAUMATICO**

---

**Celia Bonilla Horcajo**

## AGRADECIMIENTOS

---

En primer lugar, quisiera empezar dándole las gracias al Dr. Vaquero y la Dra. Zurita que hace ya algo más de cinco años me dieron la posibilidad de empezar en este mundo. Me abrieron las puertas de lo que al cabo de los años ha dejado de ser un trabajo para convertirse en un modo de vida que forma un pilar fundamental de lo que soy. Gracias por todo lo que me habéis enseñado y por lo que aún me queda por aprender.

Gracias a mis compañeros con los que convivo la mayor parte del tiempo, Conchi, Laura, Alicia, Marta y Miguel, por ayudarme, aconsejarme y por formar parte de la vida del laboratorio, de ese pequeño mundo tan sencillo y complejo a la vez, de darle vida, crear anécdotas y formar esa familia de personajes tan distintos y parecidos que conviven dentro de los muros que forman parte de la investigación.

Quisiera también agradecer la ayuda recibida por el Servicio de Estadística del Hospital Universitario Puerta de Hierro- Majadahonda (Isabel), por ayudarme a ordenar y comprender los resultados obtenidos.

Darle las gracias también al Servicio de Neurocirugía del Hospital por su aporte dentro del conocimiento de las lesiones traumáticas cerebrales y de los cuidados farmacológicos post-traumáticos, y a la Unidad de Microscopía Confocal (M<sup>a</sup> José) por las fotos obtenidas gracias a su trabajo.

No quisiera dejar de agradecer la ayuda recibida por Jose (personal del animalario), por ayudarme a cuidar y vigilar a los animales utilizados para el desarrollo del estudio.

Gracias a mis amigos, que forman ese mundo paralelo que a veces me resulta tan extraño y que me mantiene unida a la realidad.

También agradecer a la Fundación Mapfre su apoyo durante todos estos años con el cual se ha podido desarrollar gran parte del estudio realizado en la presente tesis.

En último lugar y tal vez el más importante, darle las gracias a mi familia, en especial a mis padres por siempre, pase lo que pase, estar ahí, y a Carlos, por su paciencia y apoyo.

Celia

# ÍNDICE

---

---

# ÍNDICE

---

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<hr/>	
1. TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO (TCE): Aspectos generales	2
1.1. Epidemiología	2
1.2. Clasificación de los TCE	4
1.3. Fisiopatología del trauma cerebral	6
1.4. Tratamiento del TCE	9
2. MODELO EXPERIMENTAL DE TCE	10
2.1. Diseño experimental de TCE	10
2.2. Valoración funcional	12
3. NUEVAS PERSPECTIVAS EN EL TRATAMIENTO DE LESIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)	15
3.1. Terapias neuroprotectoras	16
3.2. Terapias celulares o reparadoras	17
4. TERAPIA CELULAR EN LESIONES DEL SNC	18
4.1. Células madre	18
a) Definición y propiedades	18
b) Tipos y orígenes	21
a. Células madre embrionarias	21
b. Células madre fetales y adultas	22
4.2. CMM de la médula ósea	23
a) Obtención y caracterización	23
b) Plasticidad	25
c) Daño cerebral traumático y CMM	27



<b>HIPÓTESIS</b>	<b>32</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>36</b>
<b><u>PARTE I:</u> EFICACIA DE LA TERAPIA CELULAR EN LAS LESIONES TRAUMÁTICAS CEREBRALES CRÓNICAS</b>	<b>37</b>
1. PROCEDIMIENTO GENERAL	37
2. MODELO ANIMAL	39
2.1. Realización de la lesión cerebral traumática	39
2.2. Valoración funcional	43
a) Escala de valoración sensitivo-motora	45
b) Rotarod	46
3. TERAPIA CELULAR CON CMM EN LESIONES TRAUMÁTICAS CEREBRALES	46
3.1. Cultivo de CMM	46
a) Obtención de las CMM	46
b) Mantenimiento de los cultivos de CMM	48
c) Preparación de las CMM para los trasplantes	48
d) Caracterización fenotípica de las CMM	49
3.2. Trasplante	50
4. ESTUDIO HISTOLÓGICO	51
4.1. Caracterización inmunohistoquímica	52
a) Procedimiento general	52
b) Marcadores específicos	53
a. Estudio de marcadores neuronales y gliales	53
b. Estudio de la neurogénesis	55
c. Estudio de la proliferación	55
c) Detección de la neurogénesis y de la proliferación	55

4. 2	Hibridación In Situ: Detección del gen sry del cromosoma Y	56
a)	Expresión de marcadores neuronales y gliales de las CMM trasplantadas	57
<b>PARTE II: EFICACIA DE LA TERAPIA CELULAR EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE LESION TRAUMÁTICA CEREBRAL CRÓNICA</b>		<b>58</b>
1.	PROCEDIMIENTO GENERAL	58
2.	NIVELES DE DÉFICIT NEUROLÓGICO	59
2.1.	Modelo animal	59
a)	Realización de la lesión cerebral traumática para conseguir diferentes niveles de lesión cerebral crónica	59
b)	Cuidados de animales con lesión cerebral grave	59
2.2.	Valoración funcional para detectar niveles de lesión cerebral	63
a)	Escala de valoración sensitivo-motora	63
b)	VTB test	63
3.	Relación entre la efectividad de la terapia celular y el nivel de lesión cerebral crónica	65
3.1.	Cultivo de CMM	65
3.2.	Terapia celular con CMM	65
a)	Determinación de los grupos experimentales	66
b)	Trasplante intracerebral	67
3.3.	Seguimiento de la función neurológica después de los tratamientos	68
4.	ESTUDIO HISTOLÓGICO	68
4.1.	Volumen de la cavidad postraumática	68
4.2.	Caracterización inmunohistoquímica	69
a)	Procedimiento general	69
b)	Marcadores específicos	69
4.3.	Hibridación In Situ: Detección del gen sry del cromosoma Y	70
a)	Expresión de marcadores neuronales y gliales de las CMM trasplantadas	70
b)	Microscopía confocal	70

5. ESTUDIO ESTADÍSTICO	71
5.1 Recogida de datos	71
5.2 Estudio de la evolución de la función neurológica tras el trasplante intralesional de CMM	71
5.3 Establecimiento de los niveles de lesión cerebral	71
5.4 Eficacia de la terapia celular según el nivel de déficit neurológico permanente	72
5.5 Estudio histológico	73
a) Estudio del volumen de lesión	73
b) Estudio de marcadores neurales y detección de la neurogénesis	73
c) Estudio de proliferación celular	74

---

<b>RESULTADOS</b>	<b>75</b>
-------------------	-----------

---

<b><u>PARTE I: EFICACIA DE LA TERAPIA CELULAR EN LAS LESIONES TRAUMÁTICAS CEREBRALES CRÓNICAS</u></b>	<b>76</b>
1. ASPECTOS GENERALES	76
2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CMM	76
3. EVOLUCIÓN DE LA FUNCIÓN NEUROLÓGICA	78
3.1. Escala de valoración sensitivo-motora	78
3.2. Rotarod	79
4. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS	80
4.1. Descripción histológica	80
4.2. Neurogénesis y proliferación	81
4.3. Detección de las CMM trasplantadas	83
a) Expresión de marcadores neurales en las CMM trasplantadas	84

<b>PARTE II: EFICACIA DE LA TERAPIA CELULAR EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE LESION TRAUMÁTICA CEREBRAL CRÓNICA</b>	<b>85</b>
1. ASPECTOS GENERALES	85
2. ESTABLECIMIENTO DE NIVELES DE LESIÓN CEREBRAL CRÓNICA EN ROEDORES	86
2.1. Escala de valoración sensitivo-motora	86
2.2. Tiempo de permanencia en la zona interior (VTB test)	88
2.3. Niveles de lesión cerebral crónica en roedores	89
a) Lesión leve	90
b) Lesión media	91
c) Lesión grave	91
3. INFLUENCIA DE LA GRAVEDAD DE LA LESIÓN EN LA EFICACIA DE LA TERAPIA CELULAR	92
3.1. Establecimiento de los grupos experimentales	92
3.2. Caracterización de las CMM	93
3.3. Valoración neurológica	93
a) Escala de valoración sensitivo-motora	95
a. Lesión media	95
b. Lesión grave	95
c. Comparación entre lesión media y lesión grave	95
b) Tiempo de permanencia en la zona interior (VTB test)	97
a. Lesión media	97
b. Lesión grave	97
c. Comparación entre lesión media y lesión grave	97
4. RESULTADOS HISTOLÓGICOS	100
4.1. Estudios macroscópicos	100
a) Estudios histológicos	100
b) Volumen de lesión	102
a. Lesión media	103
b. Lesión grave	103
c. Comparación entre lesión media y lesión grave	103

4.2.	Resultados inmunohistoquímicos de la zona de lesión	106
a)	Marcadores neuronales y gliales	106
a.	NF-200	106
b.	PGFA	106
b)	Estudio de neurogénesis	109
a.	Nestina	109
b.	Dcx	112
c)	Estudio de proliferación celular	112
a.	Lesión media	112
b.	Lesión grave	112
c.	Comparación entre lesión media y lesión grave	113
d)	Resultados de Microscopía confocal	115
a.	Localización de las células trasplantadas	115
b.	Expresión de marcadores neurales de las CMM trasplantadas	116
<b>DISCUSIÓN</b>		<b>117</b>
<hr/>		
1.	CONSIDERACIONES GENERALES	118
2.	MODELO EXPERIMENTAL DE LESIÓN TRAUMÁTICA CEREBRAL	119
2.1.	Determinación de niveles de lesión cerebral	119
2.2.	Valoración funcional	122
3.	TERAPIA CELULAR Y LESIONES TRAUMÁTICAS CEREBRALES	124
3.1.	Eficacia de la terapia celular en la lesión traumática cerebral crónica	125
a)	Mejoras sensoriales y motoras	125
b)	Transdiferenciación de las CMM trasplantadas	126
c)	Aumento de la neurogénesis y de la proliferación	127
3.2.	Eficacia de la terapia celular en relación a diferentes niveles de lesión cerebral crónica	128
a)	Efecto de la Terapia celular sobre la recuperación funcional	128
b)	Efecto de la Terapia celular sobre el tejido cerebral	130

4. NUEVAS PERSPECTIVAS EN EL TRATAMIENTO DE LAS LESIONES TRAUMÁTICAS CEREBRALES	133
4.1. Terapias combinadas	133
4.2. Nuevas investigaciones	134
 <b>CONCLUSIONES</b>	 <b>138</b>

---

 <b>BIBLIOGRAFÍA</b>	 <b>140</b>
-------------------------	----------------

---

# INTRODUCCIÓN

---

## INTRODUCCIÓN

---

### **1. TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO (TCE): ASPECTOS GENERALES**

Las lesiones traumáticas cerebrales se deben fundamentalmente a la intensidad y rapidez con que la energía causante del trauma actúa sobre el cráneo, se puede definir como cualquier lesión física o deterioro funcional del contenido craneal secundario a un intercambio brusco de energía mecánica. Los TCE pueden tener consecuencias fatales o causar distintos grados de deficiencias físicas o mentales, incluso puede sobrevenir la muerte inmediatamente después del accidente traumático o a las horas o días debido a las complicaciones tardías que surgen tras el daño inicial.

#### **1.1. EPIDEMIOLOGÍA:**

En la actualidad el TCE es una de las principales causas de muerte e incapacidad en los países desarrollados. Además, representa un gran problema de salud pública ya que afecta mayoritariamente a la población joven, siendo la principal causa de muerte en personas menores de 45 años de edad (Langlois et al, 2006). Los pacientes que sobreviven a un daño cerebral pueden sufrir déficits permanentes en su función motora y sensorial, lo cual conduce a una disminución en su calidad de vida (Hawthorne et al, 2009). El nivel de los déficits adquiridos depende de la gravedad de trauma.

De acuerdo con estudios epidemiológicos existentes, la incidencia anual es de aproximadamente 200 casos por 100.000 habitantes, en los países industrializados la causa mas frecuente de TCE son los accidentes de tráfico (Thurman y Guerrero, 1999; Bruns y Hauser, 2003; Prieto et al, 2009). Existe una relación hombre/mujer de 3/1, siendo el grupo de edad de mayor riesgo el comprendido entre 15 y 25 años de edad (Prieto et al, 2009).



En una revisión epidemiológica realizada entre la población Europea se estima que la incidencia del daño cerebral traumático (hospitalizado) es de alrededor 235 casos por 100.000 habitantes y por año, con un 10% de víctimas mortales (Taglieferri et al, 2006). En España, no se dispone de datos fiables en cuanto a la incidencia anual, pero se estima que la mortalidad anual asociada a un TCE es entre 4.000 y 5.000 personas, y alrededor de unas 100.000 personas requieren ser hospitalizadas, de donde un porcentaje elevado de los pacientes que sobreviven presentan importantes secuelas neurológicas (Vaquero y Rodríguez-Boto, 2007).

### CLASIFICACIÓN DE LOS TRAUMATISMOS CRANEOENCEFÁLICOS

(Vaquero 2006; Vaquero y Rodríguez Boto, 2007)

TIPO DE TRAUMATISMO	Traumatismos abiertos	
	Traumatismos cerrados	
TIPO DE LESIÓN	Penetrante	
	No penetrante	
TIPO DE DAÑO CEREBRAL	Contusiones cerebrales	
	LESIONES FOCALES	Epidual
		Subdural
		Intraparenquimatosa
	Hematomas intracraneales	
LESIONES DIFUSAS	Daño axonal difuso (DAD)	
	Edema cerebral difuso (ECD).	
TIPO DE DAÑO TISULAR	LESIONES DEL CUERO CABELLUDO	
	Heridas epicraneales	
	Hematomas epicraneales	
	LESIONES DEL CRÁNEO	Fracturas lineales
		Fracturas deprimidas
		De la bóveda craneal
		De la base del cráneo
	Peculiares de la infancia	Fracturas evolutivas
		Fracturas en pelota de ping-pong
LESIONES ENCEFÁLICAS	Síndrome de conmoción cerebral	
	Síndrome de contusión-edema traumático	
	Daño axonal difuso	
SECUELAS	Escala de coma de Glasgow	
	Escala de recuperación de Glasgow	

**Tabla 1:** Clasificación de los TCE en función del tipo de trauma, lesión, daño cerebral o daño tisular y los métodos de valoración de las secuelas neurológicas asociadas a la lesión.

## 1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS TCE:

En cuanto a la clasificación de las lesiones traumáticas craneoencefálicas (**Tabla 1**) es clásico distinguir entre TCE abiertos y cerrados, entendiéndose como abiertos aquellos en los que tiene lugar la rotura de la duramadre; producida por un traumatismo penetrante o no penetrante, y originando daño tisular a nivel del cuero cabelludo, de los huesos craneales, de las meninges y del parénquima cerebral, o de la suma de todos ellos (Vaquero 2006; Vaquero y Rodríguez-Boto, 2007).

COMPLICACIONES DE LOS TCE		
PRECOCES	De tipo vascular	Hematoma epidural Hematoma subdural agudo Hematomas intracerebrales Fístulas carótido-cavernosas Isquemia cerebral Aneurismas traumáticos
	Otras complicaciones	Lesiones de pares craneales Fístulas de LCR Meningitis Epilepsia precoz Neumoencéfalo Hidrocefalia
TARDÍAS		Hematoma subdural crónico Fístulas carótido-cavernosas Hematomas tardíos Osteomielitis y abscesos Hidrocefalia arreabsortiva Epilepsia postraumática Síndrome postraumático

**Tabla 2:** Complicaciones en la evolución de un TCE, donde se incluyen complicaciones precoces y complicaciones tardías.

Según el tipo de daño cerebral se pueden diferenciar dos grandes grupos de lesiones cerebrales: difusas y focales. Las lesiones cerebrales focales son fácilmente identificables e incluyen las contusiones cerebrales y los hematomas intracraneales, ya sean de localización epidural, subdural o intraparenquimatosa. Por lo contrario, las lesiones difusas no son fáciles de identificar, ya que incluyen el daño axonal difuso (DAD) y el edema cerebral difuso (ECD). En el caso de un paciente que ha sufrido un TCE, hay que tener además en cuenta que existen toda una serie de factores que condicionan la mayor o menor gravedad del trauma según el alcance de las lesiones encefálicas producidas, así como una serie de complicaciones de tipo precoz y de tipo tardío en la evolución del mismo (**Tabla 2**).

<b>ESCALA DE COMA DE GLASGOW (GCS)</b>		
<b>APERTURA DE LOS OJOS</b>	Nunca	<b>1</b>
	Abre ante un estímulo doloroso	<b>2</b>
	Abre tras un estímulo verbal	<b>3</b>
	Espontáneamente	<b>4</b>
<b>MEJOR RESPUESTA VERBAL</b>	No responde	<b>1</b>
	Emite sonidos incomprensibles	<b>2</b>
	Palabras inapropiadas	<b>3</b>
	Conversa, pero está desorientado	<b>4</b>
	Conversa y está orientado	<b>5</b>
<b>MEJOR RESPUESTA MOTORA</b>	No responde	<b>1</b>
	Extensión (rigidez de descerebración)	<b>2</b>
	Flexión anormal (rigidez de descorticación)	<b>3</b>
	Flexión de retirada	<b>4</b>
	Localiza dolor	<b>5</b>
	Obedece ordenes	<b>6</b>
<b>Total</b>		<b>15</b>

TCE **leve** : GCS 15-14; TCE **medio** : GCS 13-9; TCE **grave** : GCS < 9

**Tabla 3:** Escala de coma de Glasgow sobre 15 puntos para valorar la situación clínica de un paciente con un TCE a través de su capacidad de respuesta de apertura ocular, verbal y motora.

En ocasiones la valoración clínica a nivel de conciencia es difícil debido al estado del paciente, por lo que se suele realizar una primera clasificación y valoración clínica mediante la llamada Escala de coma de Glasgow ("*Glasgow Coma Scale*", GCS; Teasdale y Jennett, 1974) (**Tabla 3**). La GCS evalúa tres tipos de respuesta de forma independiente: ocular, verbal y motora; y nos da una aproximación general del estado del paciente: leve, moderado y grave.

---

#### ESCALA DE RESULTADOS DE GLASGOW

---

<b>Muerte</b>	<b>1</b>
<b>Estado vegetativo</b> (incapaz de interactuar con el medio que le rodea)	<b>2</b>
<b>Discapacidad grave</b> (obedece órdenes, incapaz de vivir independiente)	<b>3</b>
<b>Discapacidad media</b> (capaz de vivir independiente, incapaz de trabajar)	<b>4</b>
<b>Buena recuperación</b> (capaz de volver al trabajo)	<b>5</b>

---

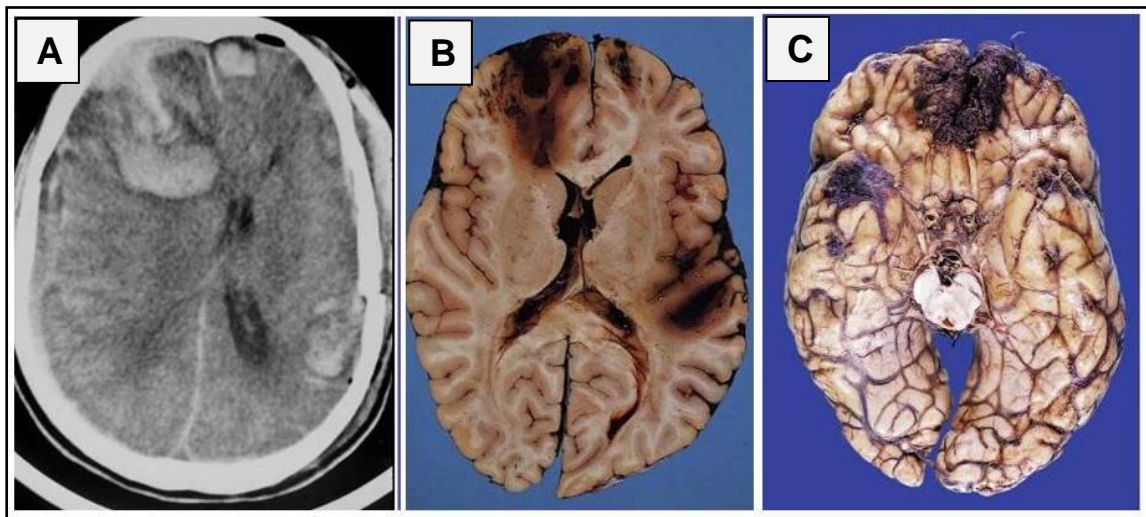
**Tabla 4:** Escala de recuperación de Glasgow sobre 5 puntos para valorar la capacidad de integración en el trabajo e independencia de un paciente tras un TCE.

El TCE produce toda una serie de eventos que evolucionan durante semanas después del trauma. Con el paso de los meses aparecen cuadros más estables, que pueden afectar a todos los ámbitos de la vida del individuo. En algunos casos las secuelas son graves y perduran toda la vida, mientras que en los casos más leves, se recuperan todas las funciones normales. Los síntomas más comunes asociados a un paciente con un TCE son los motores y los de comunicación, pero no son los únicos ni los que tienen mayor transcendencia para la reinserción laboral y familiar de los pacientes. La Escala de resultados de Glasgow (Jennett y Bond, 1975) nos ayuda a conocer el estado de un paciente que ha sufrido un TCE y cuyos síntomas ya se han estabilizado (**Tabla 4**).

### 1.3. FISIOPATOLOGÍA DEL TRAUMA CEREBRAL:

Cuando sucede una lesión cerebral se activan multitud de eventos a nivel celular, los cuales afectan a las neuronas, células gliales y células vasculares; la evolución de dichos eventos determina la extensión de la lesión cerebral y

por tanto el nivel de déficit neurológico adquirido. Todo ello hace que las lesiones anatomopatológicas que se producen tras un TCE sean muy variadas, donde la localización de la lesión y la escasa capacidad del cerebro para su recuperación funcional son factores determinantes de la morfología de los traumatismos del Sistema Nervioso Central (SNC) (**Figura 1**).



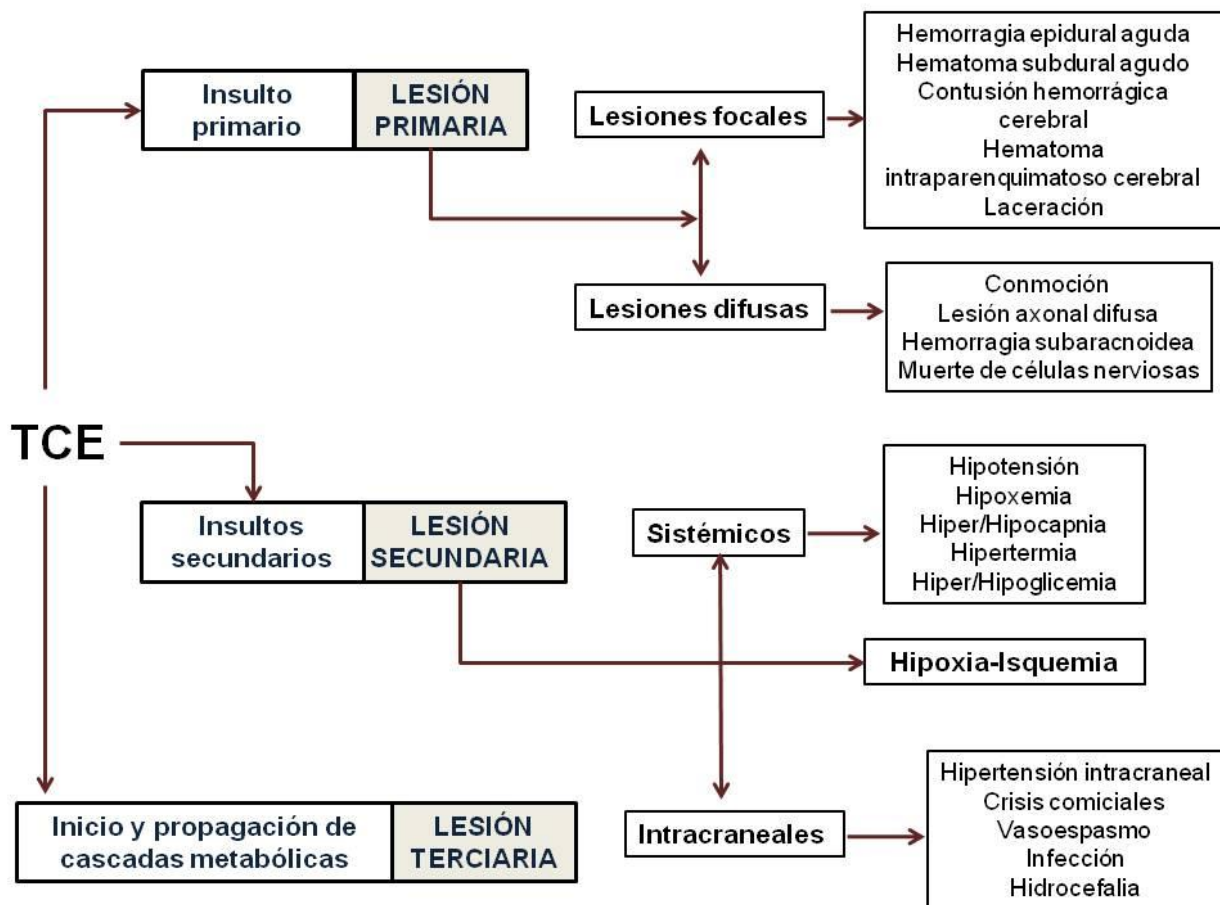
**Figura 1:** A, Tomografía axial computarizada (TAC) y, B y C, estudio necrópsico mostrando focos de contusión cerebral producidos como consecuencia de un TCE.

La principal dificultad a la hora de comprender la evolución de un TCE es que las diferentes vías fisiopatológicas se suceden o aparecen de forma simultánea, estableciéndose estrechas relaciones entre ellas. Dichos fenómenos, secuenciales e interdependientes, tradicionalmente se han dividido en lesiones cerebrales primarias y secundarias. Las lesiones primarias y secundarias presentan un desarrollo clínico evolutivo donde confluyen complejas alteraciones metabólicas, neurológicas y vasculares (Vaquero y Rodríguez-Boto, 2007).

La lesión primaria es el resultado de las deformidades mecánicas que suceden en el momento del trauma. Es responsable de todas las lesiones nerviosas y vasculares que aparecen inmediatamente después de la agresión física. Las lesiones anatómicas resultantes son la degeneración axonal difusa (principal causa del coma postraumático), muerte de neuronas y células gliales, contusiones y laceraciones. La aparición de las distintas lesiones primarias

depende del modo, intensidad y del tiempo con que las fuerzas inductoras del daño inciden sobre el cráneo y el encéfalo.

La lesión secundaria, aunque también se inicia en el momento del trauma al igual que la lesión primaria, es aquella que induce lesiones cerebrales producidas por fenómenos sistémicos e intracraneales que aparecen en los minutos, horas o incluso en los primeros días que siguen a un TCE.



**Figura 2:** Sucesión de fenómenos que comienzan tras producirse un TCE como son los producidos por el insulto primario y que desencadena la lesión primaria, los insultos secundarios que constituyen la lesión secundaria y el inicio y propagación de fenómenos metabólicos que forman parte de la lesión terciaria.

Los cambios bioquímicos que suceden a nivel celular y sub-celular y que se desencadenan también a partir del trauma inicial se engloban dentro de lo que hoy se conoce como lesión terciaria. Estos cambios también influyen en el desarrollo de la lesión secundaria.

Dado que la lesión primaria carece hoy de tratamiento específico, la reducción de la mortalidad y secuelas que se ha producido en el tratamiento de los TCE en los últimos años, viene dado al mejor control, conocimiento y prevención de los procesos que imperan en la lesión secundaria (Vaquero y Rodríguez-Boto, 2007).

Aunque esta división es útil desde el punto de vista de la interpretación de los fenómenos que aparecen tras producirse un TCE, los límites entre ellas son cada vez más difusos. La fisiopatología del TCE sigue siendo extensamente investigada ya que todavía representa un punto clave de estudio. Los modelos animales son críticos a la hora de desarrollar ensayos experimentales, y siguen siendo empleados para investigar los mecanismos de lesión primaria y secundaria asociados a un trauma cerebral (Cernak, 2005; Morales et al, 2005).

#### **1.4. TRATAMIENTO DEL TCE:**

Desde 1985 se han desarrollado multitud de estudios clínicos multicéntricos para intentar establecer las mejores pautas de actuación para tratar pacientes con TCE, casi todos enfocados en agentes farmacológicos (Narayan et al, 2002; Beauchamp et al, 2008). Pero no fue hasta 1996 (Bullock et al, 1996) cuando se publicó la primera Guía para el manejo de pacientes con TCE, en la que se da un patrón general de actuación ante este tipo de urgencias. Desde entonces, los avances se han centrado en una serie de mejoras funcionales con el fin de reducir la mortalidad, así como disminuir el tiempo de hospitalización de los pacientes y los costes asociados. De los resultados obtenidos hasta la fecha, se apunta hacia la necesidad de diseñar nuevos protocolos capaces de mejorar la recuperación motora, sensorial y cognitiva de los enfermos, y así aumentar lo máximo posible su calidad de vida (Xiong et al, 2009a).

Existen gran cantidad de estudios experimentales en animales que han probado la utilidad de mediadores farmacológicos que actúan sobre el proceso de lesión secundaria (Narayan et al, 2002), algunos de estos agentes han sido

empleados en diferentes estudios clínicos en Fase II, pero al ampliar su uso a estudios en Fase III todos han fracasado. Por lo tanto, la eficacia neuroprotectora de los agentes farmacológicos probados experimentalmente aún no ha sido demostrada para tratar lesiones cerebrales en pacientes con TCE (Doppenberg et al, 2004; Xiong et al, 2009a).

Los resultados obtenidos indican que actualmente no existe ningún tratamiento efectivo para tratar el daño cerebral traumático, exceptuando tratamientos paliativos o la evacuación quirúrgica en algunos casos. Además, algo que complica enormemente el tratamiento del TCE, es que las lesiones cerebrales traumáticas son únicas en cada paciente, donde influyen tanto los factores desencadenantes, la gravedad, así como la localización específica de la lesión en el cerebro (Prieto et al, 2009).

Por lo tanto, el trauma cerebral representa un gran problema médico y social ya que no existen terapias efectivas capaces de restablecer las secuelas que se producen tras el mismo. Si bien es cierto que a través de estrategias de neuro-rehabilitación muchos de los pacientes que han sufrido un TCE grave serán capaces de reintegrarse en su entorno familiar o profesional, siempre habrá que tener en consideración que un porcentaje elevado de los pacientes deberán convivir con importantes déficits neurológicos y neuropsicológicos. Por todo ello son numerosas las vías de investigación que están tratando de desarrollar nuevas terapias para tratar las secuelas del TCE.

## **2. MODELO EXPERIMENTAL DE TCE**

### **2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL DE TCE:**

La complejidad y heterogeneidad del TCE en humanos ha llevado en las últimas décadas al diseño de una gran variedad de modelos experimentales, ninguno de ellos por separado es capaz de reproducir los cambios fisiopatológicos que se producen en las lesiones cerebrales traumáticas,



centrándose cada uno en un aspecto concreto del daño (Leker et al, 2002; Prieto et al, 2009). Por tanto una limitación importante de los modelos experimentales es la incapacidad de reproducir la heterogeneidad del daño observado en la clínica, pero nos permiten estudiar aspectos fisiológicos, anatómicos y celulares a los que no tendríamos acceso de otra forma y nos permiten evaluar las ventajas e inconvenientes de las nuevas terapias experimentales, como paso previo a su uso en clínica.

Varios factores, incluyendo costes, han hecho de los modelos en roedores los más usados para el estudio del TCE, pero el tipo y estructura del cerebro de los mismos altera la biomecánica y por tanto la patología de la lesión cerebral (Finnie y Blumbergs, 2002; Fujimoto et al, 2004). En estos modelos se intenta reproducir las secuelas histopatológicas y de comportamiento tal y como se producirían tras el daño cerebral humano (Gennarelli, 1994; Laurer y McIntosh, 1999). Con algunos modelos se reproducen fundamentalmente lesiones difusas mientras que otros reproducen lesiones focales. El principal modelo de lesiones difusas es el modelo de percusión lateral por fluido (*Lateral Fluid Percussion model*, LFP) (Dixon et al, 1987), mientras que el principal modelo de lesiones cerebrales focales es el modelo de impacto cortical controlado (*Controlled Cortical Impact model*, CCI) (Dixon et al, 1991). El CCI produce una daño muy focal, y los parámetros son relativamente fáciles de controlar, por otro lado el LFP es a la vez focal y difuso, lo cual aunque produce déficits durante más tiempo, los parámetros son más difíciles de controlar (Fujimoto et al, 2004) (Tabla 5).

Roedores	LFP	CCI
<b>Ventajas</b>	Daño local y difuso	Daño local
<b>Desventajas</b>	Afecta a muchas áreas del cerebro.	Para detectar daños a largo plazo hay que realizar lesiones muy graves con lo que aumenta la mortalidad.

**Tabla 5:** Principales modelos animales de lesión cerebral traumática utilizados, donde se resaltan las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

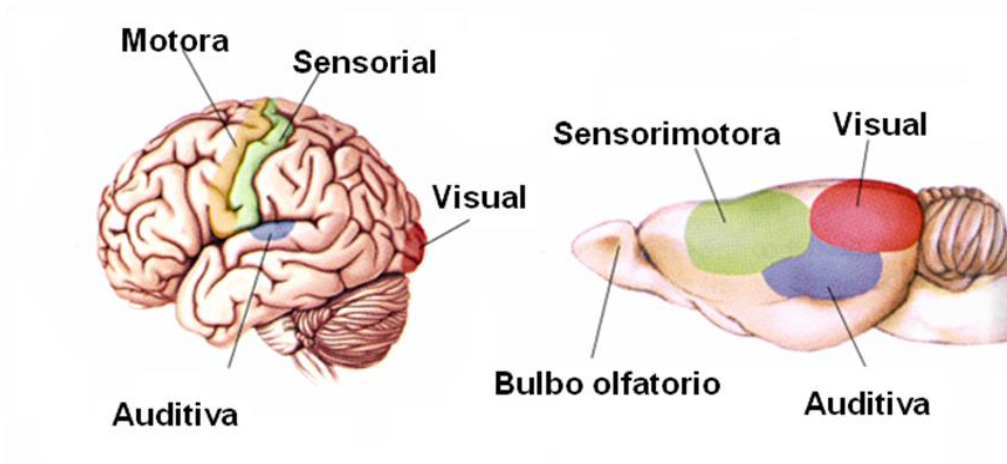
En la literatura hay multitud de estudios centrados en la fase aguda de la lesión cerebral, lo cual nos ayuda a conocer los mecanismos y procesos que suceden durante la evolución del trauma. Siempre hay que tener en consideración que el objetivo último de estos estudios es permitir que pacientes que han sufrido un TCE puedan llevar una vida larga y relativamente normal, por lo que el desarrollo de los modelos de daño cerebral en roedores debe abarcar periodos de tiempo más largos. Dichos estudios requieren la necesidad de desarrollar modelos de lesión cerebral crónica en roedores donde no sólo se estudie lo que sucede en periodos alejados del trauma, sino donde también se estudie el posible potencial terapéutico de ciertos tratamientos cuando estos se administran tardíamente desde que se produjo el TCE, y por último, cómo la efectividad de estas terapias puede estar condicionada por la gravedad de la lesión cerebral. Un problema asociado a los modelos animales crónicos de TCE es la dificultad de detectar los déficits neurológicos permanentes asociados a la lesión, para lo que es fundamental contar con test de valoración capaces de detectar los déficits motores y sensoriales de los animales empleados.

## **2.2. VALORACIÓN FUNCIONAL:**

La complejidad de las rutas anatómicas asociadas con la función motora y cognitiva hace difícil correlacionar las observaciones en el comportamiento humano con lo que sucede en pequeños animales. Además, es importante elegir tests de valoración funcional que sean relativamente fáciles de hacer e interpretar en el laboratorio. En la actualidad existen multitud de tests de valoración de las funciones neurológicas, cada uno de los cuales se encuentra destinado a medir unas características concretas de la lesión cerebral. Estos test han sido usados en multitud de estudios de recuperación de la función neurológica tras realizar diferentes terapias en modelos de daño en el SNC.

Un punto importante de la investigación experimental del TCE es poder relacionar los cambios moleculares y anatómicos resultantes como consecuencia de la lesión, con los cambios en el comportamiento y en la función motora y sensorial de los animales tratados. Los déficits causados por

un TCE producen rotura de rutas complejas motoras y de integración sensorimotora (**Figura 3**); además, existen muy pocos tests, o incluso ninguno, puramente motores por lo tanto la mayoría de los tests descritos en la literatura son sensorimotores en su naturaleza (Fujimoto et al, 2004).



**Figura 3:** Localización del área motora, sensorial, visual y auditiva sobre la corteza cerebral en humanos y roedores (Modificado de Bear et al, 2007).

Una alternativa podría ser la utilización de escalas compuestas, donde se agrupan diferentes aspectos de la lesión cerebral. Entre ellas se encuentra el *Neurological Severity Score test* (NSS). El NSS es una escala que consta de diferentes puntos que miden la respuesta motora y sensorial, así como posibles diferencias motoras y sensoriales entre el lado contralateral (lado contrario al hemisferio lesionado) e ipsilateral (mismo lado que el hemisferio lesionado) del animal de estudio. Por lo tanto el NSS es la suma de todas estas puntuaciones, provee un índice sobre la habilidad sensorimotora que permite determinar la gravedad del daño cerebral. El NSS fue originalmente descrito por Shohami et al en 1995, posteriormente en 2001(a) fue modificado por Chen et al abarcando mas aspectos del daño cerebral y también en 2001(a) (Mahmood et al) fue utilizado por primera vez en estudios de daño cerebral traumático en roedores. Los tests compuestos como el NSS están adaptados para medir la función neurológica en roedores a partir de escalas usadas en pacientes con daño cerebral como la Escala del coma de Glasgow, la Escala de recuperación de Glasgow y la Escala de incapacidad (Hudak et al, 2005). Las escalas

compuestas reflejan sutilmente las diferencias entre animales lesionados y animales sanos, pero al ser escalas que se realizan por medio de la observación también introducen subjetividad (Fujimoto et al, 2004).

Centrado fundamentalmente en la respuesta motora, aunque no exclusivamente, se encuentra el Rotarod. El Rotarod ya fue descrito en 1957 (Dunham et al), y posteriormente fue adaptado para medir el daño cerebral traumático en roedores (Hamm et al, 1994). El Rotarod es un test que mide la coordinación y el equilibrio, clásicamente se ha utilizado para valorar la respuesta motora y sensorial en modelos de hemorragia intracerebral y traumatismo cerebral sobre roedores.

El test cognitivo más usado para medir la función neurológica en modelos experimentales de daño cerebral es el *Morris Water Maze test* (MWM). El MWM fue desarrollado por Robert Morris en 1982 para examinar la memoria espacial en ratas con lesiones en el hipocampo. Posteriormente ha sido utilizado para medir la función cognitiva en modelos experimentales de daño cerebral traumático (Smith et al, 1991; Thompson et al, 2006). El MWM mide aspectos muy finos en el comportamiento de los animales, pero su desarrollo requiere un soporte técnico muy complejo, una versión ligeramente más sencilla sería la que nos ofrece el *Video Tracking Box* (VTB) junto con el programa de análisis Smart, donde se miden aspectos cognitivos de los animales grabando imágenes en video. El VTB ha demostrado su utilidad para detectar los déficits neurológicos en modelos experimentales sobre ratas tanto en lesiones hemorrágicas (Otero et al, 2010), como en modelos de lesión traumática cerebral (Bonilla et al, 2009a). No sólo se puede utilizar como herramienta donde no influye la subjetividad, sino donde además es capaz de detectar cambios en la respuesta funcional de los animales cuando se realizan terapias celulares. El poder disponer de una herramienta de estas características puede ser de gran utilidad a la hora de cuantificar el déficit real de un animal con lesión cerebral, y nos puede ayudar a discriminar entre diferentes niveles de gravedad dentro de un mismo modelo experimental.

Los modelos animales experimentales también han sido utilizados para intentar desarrollar diferentes tratamientos y estrategias de reparación y neuroprotección del tejido cerebral dañado (Harting et al, 2008a; Jain, 2008), donde la valoración de la función motora y sensorial es un punto clave para poder determinar la eficacia de las diferentes terapias (Fujimoto et al, 2004). Dichos modelos experimentales generalmente constan de una serie de variables que son difícilmente repetibles entre laboratorios, ya que en muchas ocasiones dependen de los propios investigadores. El objetivo fundamental es llegar al máximo posible de estandarización con una variabilidad mínima dentro de un laboratorio, aunque en muchas ocasiones esto no es posible. Producir una lesión cerebral estandarizable en roedores es difícil de conseguir porque depende del control de toda una serie de factores fisiológicos y a la constante monitorización de los animales, al menos durante los primeros días tras producir la lesión cerebral experimental.

Todas estas variables, afectan a la evolución del daño y en último término al nivel de déficit neurológico resultante. Debido a ello, se tienden a seleccionar los parámetros de estudio obtenidos, por lo que en la mayoría de los casos los investigadores sólo se centran en las lesiones leves y medias producidas como consecuencia de un trauma cerebral, y en algunos casos se han descrito diferentes resultados utilizando el mismo planteamiento experimental (Jones et al, 2008; Pandey et al, 2009).

### **3. NUEVAS PERSPECTIVAS EN EL TRATAMIENTO DE LESIONES DEL SNC**

En la literatura podemos encontrar diferentes revisiones en las que se analizan los nuevos tratamientos que se están desarrollando para tratar el daño cerebral traumático (Chen y Chopp, 2006; Wang et al, 2006; Xiong et al, 2009a; Zhang y Chopp, 2009), se incluyen la eritropoyetina, estatinas, metilfenidato, progesterona, dexametazona y rivastigmina. Todos estos estudios se han centrado exclusivamente en estrategias de neuroprotección del tejido,

intentando prevenir o/y reducir el daño cerebral inducido por la lesión secundaria. Además, la mayoría de los estudios clínicos llevados a cabo hasta el momento se han basado en dichas estrategias de neuroprotección. Aquellos estudios centrados en desarrollar protocolos a través de terapias que ayuden a reparar el tejido cerebral lesionado (neurorestauración) representan otra de las estrategias que actualmente se están desarrollando, y se basan fundamentalmente en el empleo de terapias celulares como células madre.

Las nuevas terapias, tales como agentes celulares o farmacológicos estimulan la neurogénesis, angiogénesis y sinaptogénesis propias del tejido, otorgándole propiedades neurorestaurativas y neuroprotectoras, y contribuyen por igual a la recuperación funcional tras sufrir una lesión cerebral (Chen y Chopp, 2006).

### **3.1. TERAPIAS NEUROPROTECTORAS:**

Los modelos experimentales de TCE han sido ideados usando una variedad de técnicas que tratan de reproducir lo más fidedignamente posible lo que sucede tras un TCE en humanos. La lesión primaria se desencadena por la acción de las fuerzas mecánicas, que a su vez inician el desarrollo de la lesión secundaria, donde suceden mecanismos que son potencialmente reversibles. Estos procesos secundarios del daño cerebral están conduciendo a un intento de manipulación farmacológica con el fin de detener o ralentizar su efecto (Finnie y Blumbergs, 2002), se trata de encontrar tratamientos que impidan o disminuyan los procesos de lesión secundaria que se inician tras un TCE.

En principio todos estos estudios tratan de activar mecanismos protectores que inhiban las rutas de muerte celular o apoptosis, tratando a su vez de aumentar la neuroplasticidad endógena del propio cerebro (neurogénesis, angiogénesis y sinaptogénesis) (Chen y Chopp, 2006; Zhang y Chopp, 2009). Su uso se limita a las primeras horas o días tras producirse la lesión, es decir durante la fase aguda del daño cerebral, ya que tratan de detener el progreso de la lesión secundaria.

Dentro de los agentes terapéuticos neuroprotectores y neurorestaurativos conocidos cabría destacar dos fundamentalmente: la eritropoyetina (EPO) (Sadamoto et al, 1998) y las estatinas (principalmente atorvastatina y simvastatina). El efecto positivo de estos agentes ha sido demostrado en estudios de daño cerebral traumático en roedores a través de un efecto neurogénico y antiapoptótico, lo cual contribuye a la reducción de los déficits neurológicos (Lu et al, 2004, 2005, 2007a; Qu et al, 2005; Xiong et al, 2008).

Otros agentes neuroprotectores que han sido empleados en modelos experimentales de daño cerebral son diversos factores neurotróficos, capaces de crear en el SNC un entorno propicio a los fenómenos de reparación, y entre ellos, se han utilizado el factor de crecimiento nervioso (Dixon et al, 1997; Zhou et al, 2003), el factor de crecimiento fibroblástico tipo 2 (Yoshimura et al, 2003), o el factor de crecimiento análogo a la Insulina de tipo 1 (Saatman et al, 1997; Guan et al, 2001). De forma simultánea se han ensayado protocolos de terapia génica, capaces de hacer llegar estos factores a las zonas lesionadas y lograr su permanencia en ellas por medio de células transfectadas (Longhi et al, 2004). Aunque estas estrategias ofrecen interesantes perspectivas, lo cierto es que su aplicación requiere aún muchos estudios en lo que respecta a las vías y pautas de administración, y al empleo de los vectores víricos utilizados.

### **3.2. TERAPIAS CELULARES O REPARADORAS:**

Una segunda línea de investigación que está cobrando importancia creciente para intentar reparar el tejido nervioso lesionado es el empleo de protocolos de terapia celular con células madre. Los resultados obtenidos en estudios experimentales permiten pensar en una no muy lejana posible aplicación de estas técnicas para paliar determinadas enfermedades humanas. Estas células serían capaces por una parte de liberar factores neurotróficos, y por otra, de reparar el tejido nervioso lesionado por medio de su diferenciación hacia células nerviosas adultas.

## 4. TERAPIA CELULAR EN LESIONES DEL SNC

El auge que están protagonizando en el ámbito científico el uso de las llamadas «células madre» y su posible potencial terapéutico para paliar determinadas enfermedades en el ser humano ha entrado de lleno en el debate social y político, y ya comienza a trasladarse al entorno clínico. El nombre de «células madre» deriva del inglés *stem cells*, donde la traducción literal significa célula tronco o célula troncal, sin embargo la terminología que más arraigada está, ya sea científica como socialmente, es la de célula madre.

En los últimos años han aumentado exponencialmente las investigaciones relacionadas con las propiedades biológicas de estas células y sobre sus posibles aplicaciones terapéuticas. Aunque aún es necesario aumentar los conocimientos adecuados que nos permitan su manipulación de forma segura para poder en un futuro disponer de terapias para muchas enfermedades que hoy en día resultan incurables, entre ellas, las enfermedades del SNC.

### 4.1. CÉLULAS MADRE:

#### a) Definición y propiedades:

Es muy difícil establecer una definición exacta que abarque los distintos tipos de células madre que hoy en día se conocen. Una célula madre es una célula indiferenciada, inmadura, capaz de dividirse simétrica o asimétricamente para dar lugar a varias células de las cuales al menos una debe ser igual a la célula progenitora.

Una célula madre puede, en principio y bajo las condiciones apropiadas, dividirse indefinidamente en el tiempo, manteniendo siempre una población estable de células madre idénticas. Además, las células madre pueden, recibiendo los estímulos correctos, diferenciarse hacia varios, muchos o todos los tipos de células especializadas de un organismo maduro.

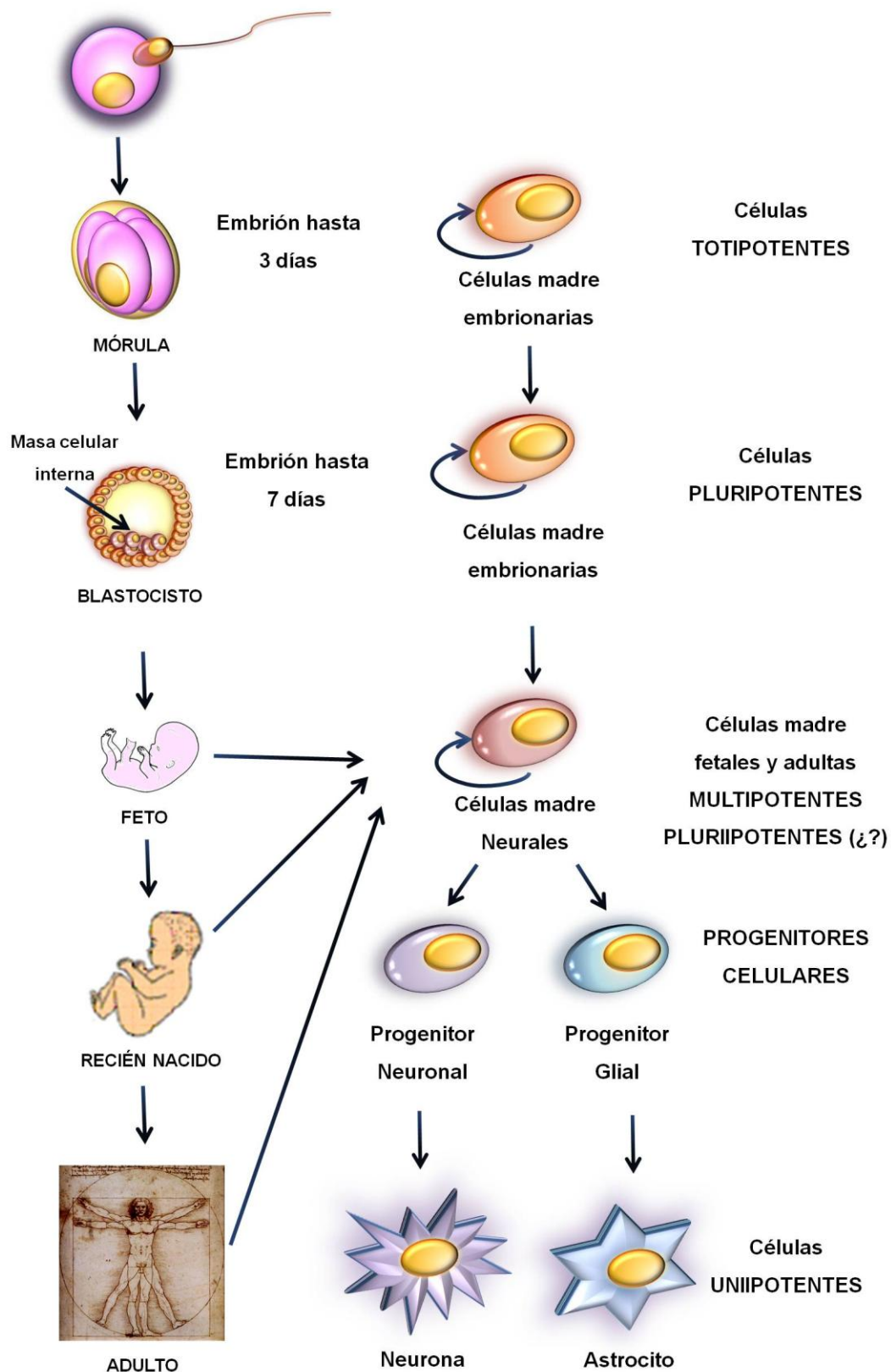


Los distintos tipos de células madre se pueden clasificar según su capacidad de diferenciación en:

- Totipotente: célula mas indiferenciada, capaz de generar todas las células de un embrión y del tejido extraembrionario.
- Pluripotente: célula capaz de diferenciarse hacia todos los tipos celulares que forman parte del embrión y del organismo adulto.
- Multipotente: célula capaz de diferenciarse hacia los tipos celulares pertenecientes a su mismo origen embrionario.
- Unipotente: célula que solo puede dar lugar a un único tipo celular.

Las células totipotentes se auto-renuevan y dan origen a células pluripotentes, las cuales también se dividen y diferencian para originar diversos tipos de células madre multipotentes, éstas a su vez dan origen a células de transición o células progenitoras que llevan finalmente a las células especializadas maduras. Una célula progenitora o precursora puede considerarse una célula madre que ya ha alcanzado una diferenciación parcial y ha perdido la capacidad pluripotencial, ya que su progresión evolutiva puede comprometerla con un determinado linaje celular y dar lugar a células especializadas específicas (**Figura 4**).

Actualmente sabemos que existen células madre en todas las etapas del desarrollo y durante toda la vida del ser humano hasta su muerte. Dependiendo del momento del desarrollo en el que obtengamos las células variará su potencialidad, ya que las células aisladas en los primeros momentos del desarrollo son células más primitivas y por lo tanto tienen mayor capacidad de proliferación y diferenciación (Temple 2001), además, pueden ser cultivadas *in vitro* bajo las condiciones específicas que requieran (McKay 2000; Lovell-Badge 2001).



**Figura 4:** Tipos de células madre según su origen y propiedades de auto-renovación y potencialidad de las mismas según el momento de desarrollo, desde un cigoto hasta la formación del tejido nervioso maduro. A medida que se avanza en el desarrollo se van restringiendo estas propiedades y disminuye el número de células que las conservan.

### **a) Tipos y orígenes**

Hay que tener en cuenta que la definición y clasificación de las células madre atiende a un criterio puramente funcional y no morfológico, se realiza en base a propiedades observadas experimentalmente y bajo condiciones específicas y controladas. Uno de los principales problemas dentro del campo de la investigación con células madre es la falta de marcadores específicos que nos indiquen inequívocamente si una célula es una célula madre o qué tipo de célula madre es.

A continuación detallamos algunos de los tipos de células madre que están siendo investigadas actualmente en cuanto a sus propiedades biológicas y su potencial como herramientas terapéuticas para tratar enfermedades del SNC.

#### **a. Células madre embrionarias:**

El término de célula madre embrionaria (CME) fue acuñado en 1981 para definir las células embrionarias procedentes de la masa celular interna de un embrión pre-implantacional en el estado inicial de blastocisto (hasta el día 4-5 de gestación en humanos o día 4 en ratones). Al comienzo de la década de los 80 se obtuvieron las primeras CME procedentes de ratón (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981), pero no fue hasta bien entrada la década de los 90 cuando se obtuvieron las primeras células madre procedentes de embriones humanos (Thomson et al, 1998). Desde entonces se ha desarrollado una intensa investigación entorno a las propiedades biológicas y potencialidad terapéutica de estas células.

Las CME son células pluripotenciales, con capacidad de generar todos los tipos celulares de un embrión aunque no pueden dar origen a las células que forman parte de los anejos extraembrionarios. En cultivo han demostrado una gran capacidad de proliferación y auto-renovación, lo que las hace muy interesantes a la hora de obtener gran cantidad de células para su posible aplicación en estudios experimentales y tal vez en un futuro en estudios clínicos. Por el contrario, también presentan un elevado riesgo de formación de teratomas si

son trasplantadas experimentalmente cuando se encuentran en estado proliferativo (Olsson et al, 1997; Bjorklund et al, 2002). Se ha demostrado su gran potencial de diferenciación hacia todos los fenotipos posibles, tanto *in vitro* como *in vivo* (Donovan y Gearhart 2001; Lovell-Badge 2001).

En relación al uso de las CME en lesiones del SNC, uno de los primeros estudios experimentales se hizo utilizando dichas células en un modelo de parkinson en roedores (Yoshizaki et al, 2004), detectándose una mejora parcial en los déficits motores. En un trabajo publicado en el 2007, trasplantaron CME 3 días post-TCE directamente en el cerebro de los roedores detectando mejoras en la función motora, pero las células resultaron indetectables 7 semanas después del tratamiento, y en 2 de 10 animales se generaron tumores (Riess et al, 2007).

Las CME despertaron un gran interés como posible herramienta terapéutica para tratar diferentes enfermedades, pero es difícil que por el momento estos estudios lleguen a una aplicación clínica en pacientes, por las dificultades, tanto técnicas como ético-legales, políticas y religiosas, a la hora de poder aislar o manipular este tipo de células, así como la posibilidad de generar tumores, por ello, más frecuentemente se emplean las células madre adultas (CMA).

#### **b. Células madre fetales y adultas:**

Es posible aislar células que cumplan las dos condiciones básicas que definen a una células madre (capacidad de auto-renovación y de diferenciación) tanto de fetos en desarrollo como de un organismo adulto.

En el adulto se han identificado y aislado células madre somáticas o adultas de la médula ósea, sangre periférica, piel, epitelio intestinal, endometrio, hueso, corazón, músculo esquelético, vasos sanguíneos, córnea, pulpa dentaria, hígado, tejido adiposo y sistema nervioso (cerebro, médula espinal, bulbo olfativo, mucosa olfatoria y retina) (Tárnok et al, 2010). La esperanza terapéutica principal que se tiene con el uso de las CMA es la posibilidad de realizar trasplantes autólogos para tratar determinadas enfermedades

humanas, sin la necesidad de administrar drogas inmunosupresoras con sus nocivos efectos secundarios.

Las CMA son escasas y representan un porcentaje muy bajo del número total de células de un tejido adulto. Se piensa que juegan un papel fundamental dentro de los tejidos ya que se encargan de renovar las poblaciones celulares envejecidas o que puedan haber sufrido algún tipo de daño, realizando una tarea de auto-renovación y mantenimiento de la homeostasis tisular (Scadden 2006).

Se han utilizado distintos tipos de CMA en ensayos de terapia celular sobre lesiones cerebrales experimentales en roedores, entre las que se encuentran células madre fetales neurales (Gage 2000; Temple 2001; Lu et al, 2002; Gao et al, 2006), células madre de cordón umbilical (Chen et al, 2001b), y células madre obtenidas a partir de tejido adiposo (Kang et al, 2003; Lee y Yoon, 2008). Pero sin ninguna duda las CMA con la que posiblemente se están realizando una mayor cantidad de estudios debido a su relativamente fácil obtención y manipulación en laboratorio son las células madre mesenquimales o estromales (CMM) obtenidas de la médula ósea.

## **4.2. CMM DE LA MEDULA OSEA**

### **a) Obtención y caracterización**

Las CMM de la médula ósea constituyen una población muy heterogénea totalmente diferente de las células madre hematopoyéticas, y su papel principal es contribuir a la regeneración de los tejidos de origen mesenquimal tales como hueso, cartílago, músculo, ligamento, tendón, tejido adiposo y estroma (Prockop, 1997). Estas células mesenquimales se aíslan en cultivo a partir de la fracción mononuclear de las células de la médula ósea. En 1976 Friedenstein describió por vez primera la técnica para obtener estas células a partir de una característica que las hace relativamente fáciles de manejar en laboratorio, ya que las CMM se obtienen clásicamente por su tendencia de

adhesión al plástico de los frascos de cultivo. Dichas células pueden dividirse rápidamente y por ello son habitualmente utilizadas en trabajos experimentales de laboratorio donde muestran características fenotípicas heterogéneas cuando se las pone en cultivo, observándose distintas morfologías celulares (Bianco et al, 2001).

En el 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular especifico los criterios mínimos para definir a una CMM humana (Dominici et al, 2006), los cuales se resumen en tres puntos fundamentales.

- En primer lugar se trata de células que bajo condiciones de cultivo estándar se adhieren al plástico de los frascos de cultivo.
- En segundo lugar se utiliza una cierta caracterización fenotípica, ya que, aunque no existen marcadores específicos que las identifique deben expresar en más de un 95% CD105, CD73 y CD90; para asegurar que las poblaciones de CMM no son confundidas con células hematopoyéticas se utiliza un criterio adicional, como es la falta de expresión de antígenos hematopoyéticos (expresión menor al 5%): CD45, CD34, CD14 o CD11b y CD79α o CD19. Por ultimo dentro de esta caracterización fenotípica las células no deben expresar HLA-DR (antígeno humano leucocitario) a no ser que se estimule el cultivo con IFN-γ (Interferon-γ).
- La tercera propiedad que se utiliza es posiblemente la que mejor caracteriza a las CMM y es su capacidad de diferenciación hacia los tres linajes mesenquimales (condroblastos, osteoblastos y adipocitos), usando para ello condiciones estándar de cultivo *in vitro* de diferenciación hacia diferentes tejidos.

Estos criterios solo se aplican a CMM humanas, mientras que dos de las propiedades descritas (adherencia al plástico y diferenciación hacia los tres linajes mesenquimales), son característicos de CMM de otras especies, como las murinas.

Por otro lado, aunque la expresión de antígenos de superficie no está universalmente bien caracterizada (Tropel et al, 2004; Harting et al, 2008b), se sabe que las CMM no expresan antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase II (Ho et al, 2008), por lo que tienen baja antigenicidad, siendo ésta una de sus principales ventajas a la hora de plantear su utilización en protocolos de terapia celular. Además, de forma característica tienen una alta expresión de factores de crecimiento, citoquinas y moléculas de la matriz extracelular (fibronectinas, laminina, colágeno y proteoglicanos), las cuales en condiciones normales, contribuyen a la formación y función del microambiente del estroma de la médula ósea, induciendo señales reguladoras no solo para las células estromales sino también para las células madre hematopoyéticas.

### **b) Plasticidad**

En principio a las CMA se las considera como multipotenciales ya que son capaces de dar lugar a los tipos celulares presentes en el propio tejido al que pertenecen. A partir de ellas se generan precursores o progenitores celulares comprometidos los cuales se dividen, aunque no indefinidamente, y su capacidad se limita a generar células especializadas (Temple 2001). En general las CMA tienen una capacidad de proliferación *in vitro* mas limitada que las CME.

Desde hace unos años nuevos experimentos están haciendo reconsiderar el concepto de la plasticidad de las CMA, ya que bajo ciertas condiciones *in vitro*, estas células están demostrando mayor potencial en lo referente a su plasticidad de lo que se creía hasta ahora. Se ha comprobado que, tanto *in vitro* como en trasplantes *in vivo*, podrían generar tipos celulares distintos de los de su origen. Las CMM pueden ser inducidas *in vitro* para diferenciarse en multitud de linajes celulares diferentes bajo la adición de determinados agentes químicos a los medios de cultivo (Mezey y Chandross, 2000; Sánchez-Ramos et al, 2000; Woodbury et al, 2000; Hung et al, 2002 Dewaza et al, 2004; Hermann et al, 2004; Bossolasco et al, 2005). Se sabe que estas células pueden diferenciarse no solo hacia células de su misma línea germinal, como

condroblastos, osteoblastos, o mioblastos, sino que bajo determinadas condiciones pueden diferenciarse hacia células de una hoja embrionaria distinta como células endoteliales o neuroectodérmicas (Dewaza et al, 2004; Kotobuki et al, 2004; Benayahu et al, 2007; Parr et al, 2007). Dicho fenómeno de diferenciación hacia células de diferente origen embrionario es lo que se conoce como “transdiferenciación”, aunque hay quien cree que estas observaciones podrían deberse a fenómenos de fusión celular (Álvarez-Dolado et al, 2003). No existe un consenso general que identifique estos mecanismos realmente como de transdiferenciación celular, o si se deben realmente a procesos de desdiferenciación, reprogramación génica, fusión celular o varios de ellos a la vez (Wurmser y Gage 2002; Ying et al, 2002).

Recientes observaciones realizadas en nuestro laboratorio acerca de la plasticidad de las CMM, nos llevan a pensar que aunque estas células son en principio multipotenciales, bajo determinados estímulos pueden transdiferenciarse a células nerviosas, tanto *in vitro* como *in vivo*, lo cual las confiere un carácter pluripotencial. Hay evidencias de una posible transdiferenciación neuronal *in vitro* de células madre del estroma de la médula ósea por medio de sustancias químicas o factores de crecimiento (Zurita et al, 2007a, 2008a). Aunque se cuestiona que la diferenciación química de las células en cultivo sea realmente una auténtica transdiferenciación, posiblemente se debe a una transformación de las células a células con aspecto neuronal debido posiblemente a alteraciones morfológicas inespecíficas del citoesqueleto celular, ya que esta transformación a células con apariencia de neuronas desaparece en cuanto los agentes químicos inductores del cambio son retirados del medio de cultivo. En el 2007 se publicó en nuestro laboratorio un trabajo en el que se logró transformar CMM hacia células neurales a través de lo que se podría llamar un método biológico, que consistía en su cultivo en presencia de células de Schwann (Zurita et al, 2007b). En dicho trabajo se demostró que en presencia de factores solubles aportados por células gliales se puede lograr una transdiferenciación neural de las CMM que se mantiene de forma indefinida.



En cuanto a la necesidad de manipular o no las CMM antes de su implantación en el SNC existen grupos que aportan una amplia experiencia con el empleo de las CMM de la médula ósea en modelos experimentales de lesión traumática de la médula espinal (Chopp y Li, 2002; Hofstetter et al, 2002; Lee et al, 2003; Ankeny et al, 2004), obteniéndose también buenos resultados funcionales tras el trasplante intralesional de dichas células en las lesiones medulares crónicamente establecidas (Vaquero et al, 2006; Zurita y Vaquero, 2006; Zurita et al, 2008b).

Como consecuencia de todos estos estudios se han obtenido evidencias a favor de que las CMM no requieren ser diferenciadas *in vitro* antes de su implantación en zonas lesionadas del SNC para lograr un efecto funcional beneficioso, lográndose este efecto tanto a través de una transdiferenciación local por factores ambientales, como posiblemente, al menos en las fases inmediatas tras el trasplante, por medio de la liberación de factores tróficos capaces de inducir a su vez la proliferación de células madre neurales endógenas (Chen et al 2002; Lu et al, 2003; Mahmood et al, 2004a) y por último, realizando un efecto protector sobre las células que permanecen en las zonas lesionadas.

### **c) Daño cerebral traumático y CMM**

En los últimos años se han iniciado diversos ensayos experimentales que tratan de estudiar el efecto terapéutico de las CMM en las secuelas del trauma cerebral, con el propósito de encontrar datos que permitan aplicar esta forma de terapia celular en ensayos clínicos con pacientes. Ya en el 2001, se realizó un primer ensayo experimental en el que se trasplanto médula ósea completa en un modelo de daño cerebral traumático, donde se observó que las células sobrevivían, migraban al parénquima cerebral diferenciándose a neuronas y astrocitos y mejoraban la función motora (Mahmood et al, 2001b). Aunque dichos resultados son difícilmente atribuibles a la acción de las células madre de la médula ósea ya que el trasplante se realizó a los pocos días del TCE y donde las mejoras funcionales podrían ser consecuencia de la propia evolución de las lesiones cerebrales.

Se han realizado multitud de estudios tratando de discriminar cual es el mejor momento y forma de administrar las células dentro de la primera semana, es decir durante la fase aguda, tras producirse el trauma cerebral, para así optimizar al máximo el potencial terapéutico de las células trasplantadas ya sea por medio de trasplantes intraarteriales (Lu et al, 2001a), como intravenosos (Lu et al, 2001b; Mahmood et al, 2001a, 2003, 2004b).

Con la administración intravenosa e intraarterial se ha observado recuperación funcional al menos hasta tres meses después de realizar los tratamientos. Dicho efecto también es difícil de explicar por la propia acción de las células sobre el tejido cerebral, ya que las células se distribuyen por todo el cuerpo, localizándose muy pocas en la zona de lesión, y de ellas un porcentaje muy pequeño muestra fenotipos de células neurales o gliales. Otra observación realizada en estos experimentos fue una mayor producción de factores de crecimiento (NGF, BDNF) asociado a aquellos animales que recibieron la terapia celular (Mahmood et al, 2004b; Lu et al, 2006). Finalmente, se ha observado que para el tratamiento del daño cerebral en fase aguda existe una relación de dosis dependencia, es decir el número de células trasplantadas está directamente relacionado con la respuesta en la recuperación funcional (Mahmood et al, 2005, 2006).

Por último también se ha comprobado la utilidad del trasplante intracerebral de CMM donde se ha observado que reducen los déficits funcionales aparecidos inmediatamente tras sufrir un accidente vascular (Chen et al, 2001a) o un traumatismo (Chopp et al, 2002; Mahmood et al, 2002), debido también a su administración en fase aguda, es decir a las horas o pocos días tras producirse la lesión. Se piensa que la recuperación funcional puede ser el resultado de la interacción de las células trasplantadas con el cerebro, lo cual se refleja en un aumento en la producción de factores tróficos y citoquinas.

Como ya se ha mencionado, las principales características asociadas a las CMM son su capacidad de diferenciación hacia elementos neurales y su capacidad de migración. Dichas características hacen de estas células un objetivo muy atractivo como terapia para ayudar a recuperar las lesiones

asociadas a un TCE ya que podrían actuar a través de dos posibles mecanismos: por un lado, por la activación de las propias células progenitoras neurales, ya que se sabe que las CMM son bombas liberadoras de factores tróficos (Chen et al, 2002) y por otro lado, contribuir a la reparación del tejido dañado, ya que estas células son implantadas en la propia lesión (Hofstetter et al, 2002).

Estudios realizados recientemente demuestran que las CMM, tras ser trasplantadas en el parénquima lesionado, se diferencian a neuronas, integrándose en el tejido formando parte de circuitos neuronales y obteniéndose signos de recuperación funcional (Qu et al, 2008; Harting et al, 2009; Li et al, 2009). La hipótesis que se maneja al respecto señala que esta recuperación funcional puede deberse a una interacción entre las células trasplantadas y el tejido cerebral, lo cual se refleja en una producción de factores de crecimiento y citoquinas. Pudiendo ser el efecto el aumento de la proliferación celular después del trasplante de las CMM (Mahmood et al, 2004a).

Cuando se revisa la literatura existente, llama la atención que prácticamente todos estos estudios se han desarrollado a las pocas horas o días tras producirse una lesión cerebral y aunque se llega a recuperar la función neurológica de los animales, en ningún caso se consigue reducir el volumen de la lesión cerebral, y aún menos se relaciona con el nivel de deterioro neurológico de los animales en su inicio. En el 2007 se publicó un trabajo en el que trasplantaron CMM intravenosamente 1 mes después de producir una isquemia cerebral en ratas, resultando en una mejora funcional significativa respecto de los controles, así como en una mayor proliferación y diferenciación (Shen et al, 2007). En nuestro laboratorio hemos demostrado que dicha terapia es igualmente beneficiosa cuando la administración se realiza intralesionalmente en ratas con dos meses de evolución de una lesión cerebral traumática, detectándose mejoras significativas en la recuperación funcional de los animales tratados (Bonilla et al, 2009b). Al igual que sucede en los estudios realizados en fase aguda, hemos verificado que, dos meses tras

realizar el trasplante, las CMM sobreviven y expresan marcadores típicos de células neuronales y gliales.

En ninguno de los estudios realizados hasta la fecha en modelos animales para tratar las secuelas producidas como consecuencia de un TCE se ha tenido en cuenta el grado de lesión de los animales tratados, y si la eficacia de las terapias realizadas puede verse afectada por el nivel de lesión cerebral de los animales. Un posible problema asociado con esta falta de evidencias experimentales es que el principal factor que contribuye a determinar los déficit neurológicos es la muerte celular, dicho factor es muy difícil de predecir y de manipular en roedores. El conocimiento de las rutas moleculares que suceden tras producirse un TCE todavía no han sido definidas en su totalidad, pero se sabe que la muerte de células neuronales inducidas por el trauma está íntimamente relacionado con el daño cerebral oxidativo (Werner y Engelhard, 2007) que produce procesos inflamatorios y la activación de mecanismos de muerte celular programada (apoptosis) (Faden, 2002; Vink y Nimmo, 2002; Chong et al, 2005). Todos estos procesos contribuyen al desarrollo del daño neuronal secundario comúnmente observado tras un TCE (Darwish et al, 2007), y en último lugar a establecer el nivel de déficit neurológico permanente.

Cuando se produce un TCE, en el que ya se han desarrollado los procesos de lesión primaria y lesión secundaria, el tejido se reabsorbe quedando como resultado un gran agujero allí donde se produjo el daño y un nivel estable de déficit motor y sensorial. El desarrollo de protocolos de administración de células madre en fases tardías tras producirse una lesión, puede tener un gran potencial dentro del tratamiento de las secuelas cerebrales crónicas establecidas. Estas células por un lado pueden formar una serie de interacciones con las propias células del cerebro que active, a través de la producción de factores neurotróficos y citoquinas, a las propias células madre neurales induciéndolas a proliferar y reparar el tejido lesionado, y por otro lado las propias células trasplantadas pueden ser capaces de integrarse en el circuito neuronal dañado, proliferando y diferenciándose hacia elementos neurales, produciéndose la disminución del volumen de la lesión. Todo ello puede contribuir a una mayor recuperación sensorial y motora.

Por otro lado, los déficits neurológicos permanentes dependen de la gravedad del trauma y de su evolución, y como se ha visto hasta el momento no existen suficientes evidencias experimentales acerca de la utilidad de estas terapias en fase crónica de la lesión cerebral, y aún menos en cómo estas terapias pueden ser útiles para tratar a pacientes con niveles diferentes de déficit neurológico. Por lo tanto resultaría interesante estudiar el efecto de la terapia celular sobre la lesión cerebral crónica y si con la misma terapia se consigue el mismo resultado independientemente del nivel de déficit neurológico adquirido.

Por todo ello aún existen múltiples cuestiones que deben ser resueltas al objeto de optimizar los protocolos experimentales y antes de plantear los parámetros con los cuales estas nuevas técnicas podrían ser aplicadas en clínica humana, a algunas de las cuales se las intentará dar respuesta a lo largo del presente trabajo de investigación.

# HIPÓTESIS

---

## **HIPÓTESIS**

---

La hipótesis de trabajo de la que partimos es que la administración de CMM, obtenidas del estroma de la médula ósea, en zonas del Sistema Nervioso donde se ha producido un daño cerebral con pérdida de tejido, es capaz de revertir los déficits funcionales secundarios a la lesión traumática, y que dicho efecto puede estar condicionado por la gravedad de la lesión cerebral postraumática.

# OBJETIVOS

---



## OBJETIVOS

---

Para intentar dar respuesta a nuestra hipótesis de trabajo, se planteó cumplir los siguientes objetivos:

1. Comprobar la posible utilidad del trasplante intralesional de CMM obtenidas de la médula ósea en un modelo crónico de lesión cerebral traumática desarrollado en ratas Wistar adultas.
2. Determinar si la posible eficacia terapéutica del trasplante intralesional de CMM sobre nuestro modelo de lesión cerebral crónico puede verse condicionada por el grado de lesión neurológica permanente.
3. Comprobar a través de test de valoración funcional la posible utilidad del trasplante intralesional de CMM sobre los déficits neurológicos, cuantificando la posible recuperación sensorial como motora.
4. Comprobar la posible integración y supervivencia de las CMM en el tejido cerebral, detectando las células trasplantadas dentro del mismo así como su posible diferenciación a células neuronales y gliales.
5. Comprobar la utilidad del trasplante de CMM como mecanismo de activación de la neurogénesis endógena y de la proliferación de células dentro del tejido cerebral dañado, cuantificando dicho efecto.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

---

El desarrollo de los objetivos principales planteó la necesidad de desarrollar el presente trabajo en dos partes secuenciales:

### **PARTE I:**

#### **EFICACIA DE LA TERAPIA CELULAR EN LAS LESIONES TRAUMÁTICAS CEREBRALES CRÓNICAS**

### **1. PROCEDIMIENTO GENERAL**

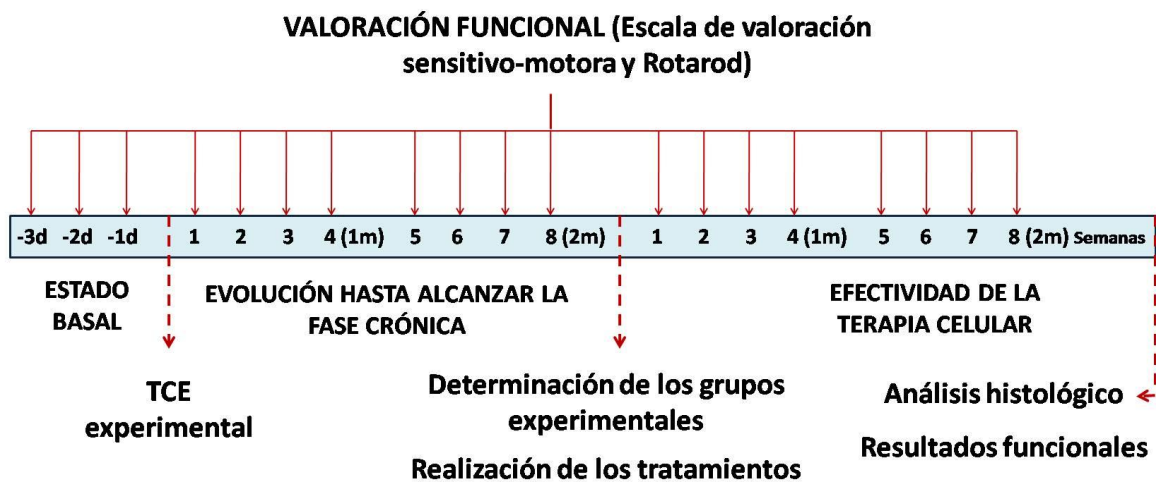
Todos los estudios con animales del presente trabajo fueron aprobados por el comité de experimentación del Hospital Puerta de Hierro-Majadahonda.

Para su realización se utilizaron ratas Wistar hembras de 3 meses de edad y cuyo peso estuviera comprendido entre 225 y 250 g (Charles River Laboratories International, Inc). Los animales se mantuvieron en jaulas colectivas (2-3 animales por jaula) en estabularlo bajo condiciones controladas: temperatura (18-23º) y ciclos de luz y noche de 12 horas (comenzando la luz a las 8 de la mañana). En todo momento los animales tenían acceso libre a comida y agua. Se realizaron todos los esfuerzos posibles para utilizar el número mínimo de animales para la realización de los estudios.

El número total de ratas necesario para el desarrollo de la primera parte del presente trabajo se estableció en 20 animales, aunque el número real utilizado se determinó en función de la capacidad de los animales de sobrevivir y de ser independientes después de la realización del trauma cerebral experimental, siendo finalmente 29 ratas.

Antes del procedimiento quirúrgico de lesión todos los animales fueron valorados a través de una serie de test funcionales para establecer su estado basal. Tras la inducción del trauma cerebral las ratas se dejaron recuperar durante una semana, momento a partir del cual todas volvieron a ser sometidos a la batería de test funcionales semanalmente, durante los dos meses siguientes para definir su lesión cerebral crónica. Una vez que los animales fueron valorados se distribuyeron aleatoriamente para establecer los grupos experimentales para recibir los diferentes tratamientos.

Después de realizar los tratamientos se siguió la evolución de los animales durante dos meses para poder determinar la efectividad de la terapia, para ello se utilizaron los tests funcionales utilizados previamente. Todas las pruebas neurológicas y funcionales fueron realizadas durante la fase diurna, entre las 9:00 y las 12:00, en una habitación sin ruido bajo una luz constante. En la **Figura 5** se muestra la cronología de los experimentos.

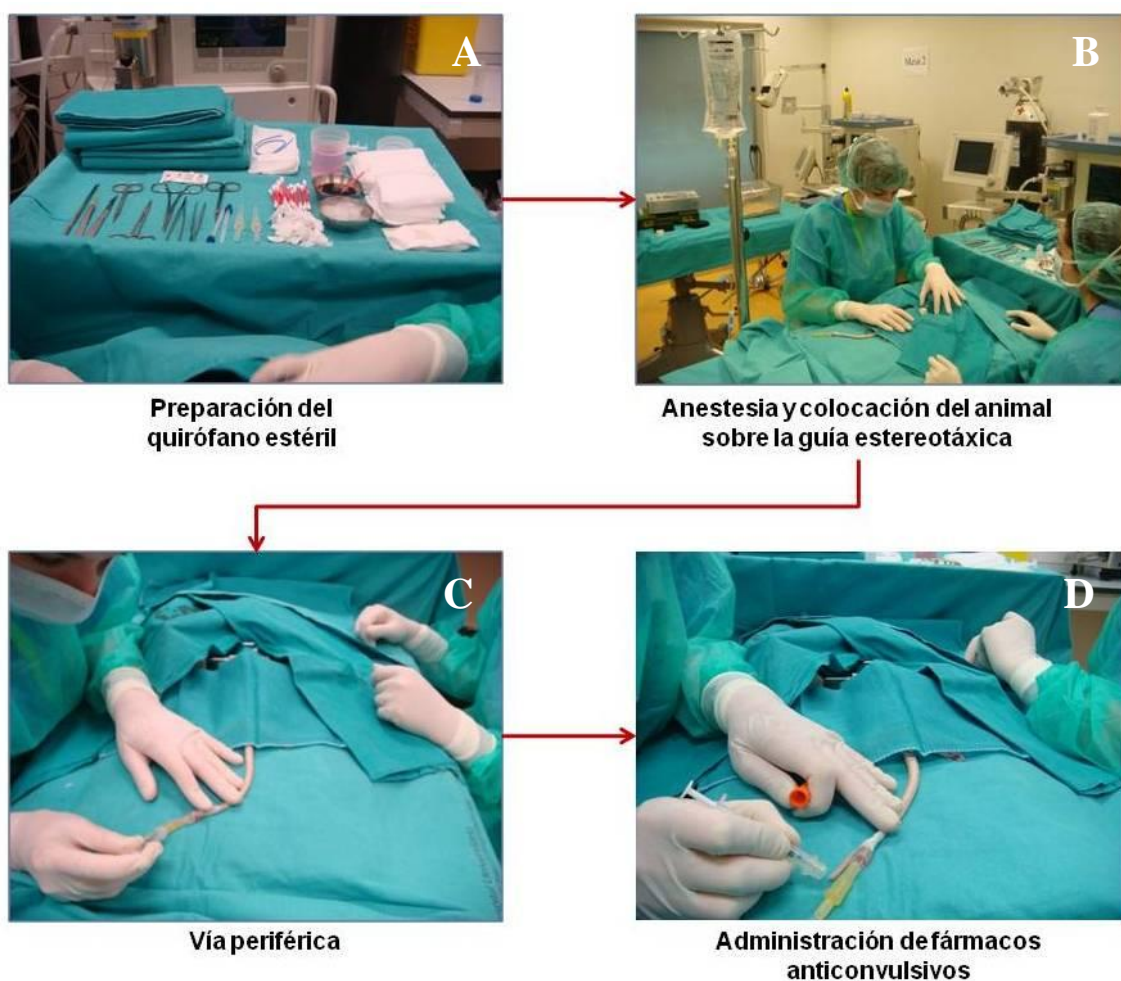


**Figura 5:** Cronología de los experimentos realizados durante el desarrollo de la PARTE I del presente trabajo. Primero, obtención de la valoración basal de los animales, seguido de la realización del TCE experimental. Segundo, estudio de la efectividad de la terapia celular para tratar las secuelas de la lesión traumática cerebral.

## 2. MODELO ANIMAL

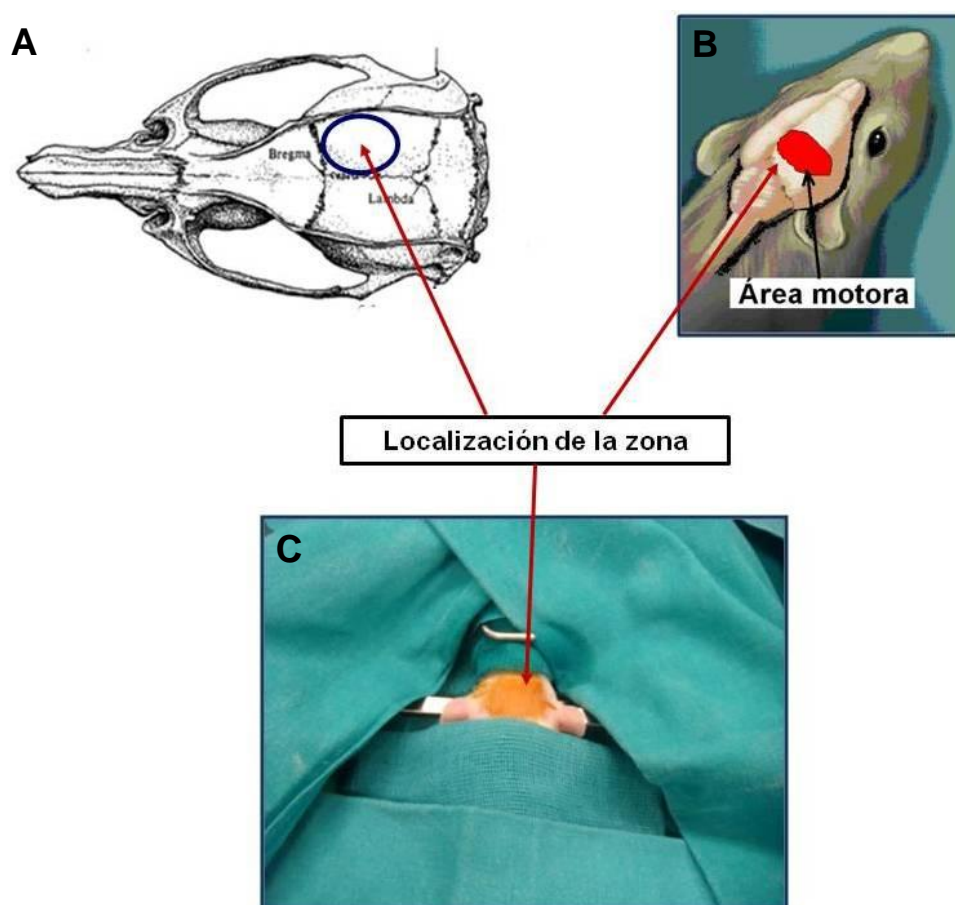
### 2.1. REALIZACIÓN DE LA LESIÓN CEREBRAL TRAUMÁTICA

En el presente estudio se utilizaron 29 ratas Wistar hembras. Todos los animales fueron premedicados 24 horas antes de la realización del trauma cerebral con fenitoína (5 mg/kg) intravenosa para evitar posibles crisis epilépticas producidas como consecuencia de la lesión cerebral.



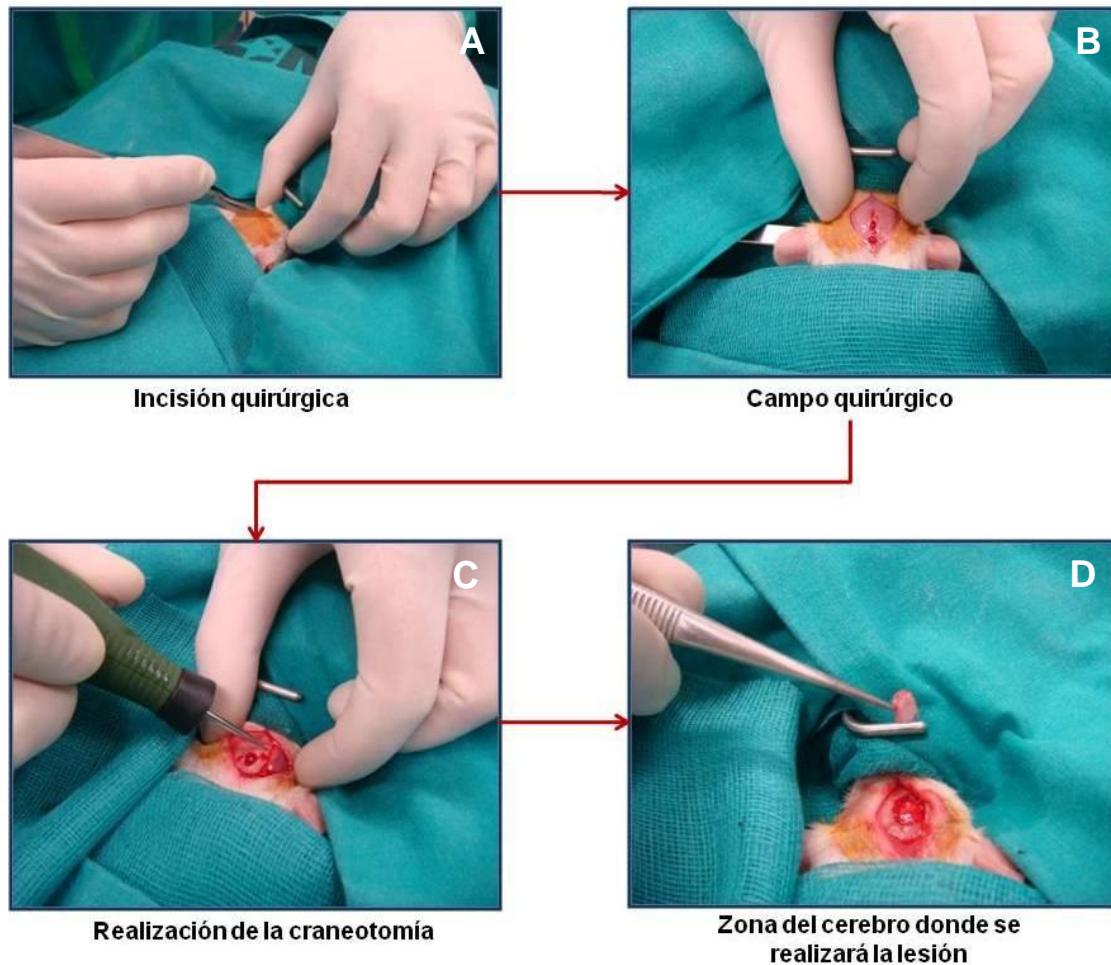
**Figura 6:** Pasos previos a la realización del TCE experimental en ratas: **A**, preparación del material necesario y el quirófano estéril; **B**, anestesia de los animales y colocación de los mismos en la mesa de cirugía sobre la guía estereotáxica; **C**, canulación de la vía periférica para la administración intravenosa de Ringer-Lactato; y **D**, administración de fármacos anticonvulsivos.

Previo a la realización de la lesión cerebral traumática se preparó todo el material necesario realizándose la cirugía en un quirófano estéril. Para inducir la anestesia a los animales, éstos fueron colocados en una cámara cerrada con un flujo de oxígeno continuo de 3 L/min y 8% de sevoflurane. Una vez realizada la anestesia, fueron medicados con morfina subcutánea (2,5 mg/kg) y meloxicam (2 mg/kg). Se procedió a coger una vía periférica en una vena periférica de la cola, a través de la cual se les administró Ringer-lactato a una velocidad de 2,5 mL/h con el fin de mantener a los animales hidratados en todo momento y antibiótico intravenoso (Gentamicina 9 mgr/kg). Posteriormente fueron colocados en la mesa de cirugía sobre una base estereotáxica, donde la anestesia se administró a través de una mascarilla con un flujo de 2,5-3% de sevoflurane y 3 L/min de oxígeno. Durante la cirugía las ratas respiraban espontáneamente (**Figura 6**).



**Figura 7:** Área de lesión: **A** (Modificado de Paxinos y Watson, 1998, p. 11) y **B**, relación entre el hueso parietal y el área motora en ratas (Modificado de Smith, 2007); **C**, localización de la zona en el animal una vez colocado sobre la guía estereotáxica.

Posteriormente se procedió a localizar la zona donde realizar la incisión quirúrgica. En la rata el área motora y sensorial del cerebro se encuentra bajo el hueso parietal del cráneo (**Figura 7**) (Machado et al, 2003), de modo que las lesiones producidas en la misma provocan déficits motores y sensoriales en los animales, que posteriormente se pueden medir y cuantificar.

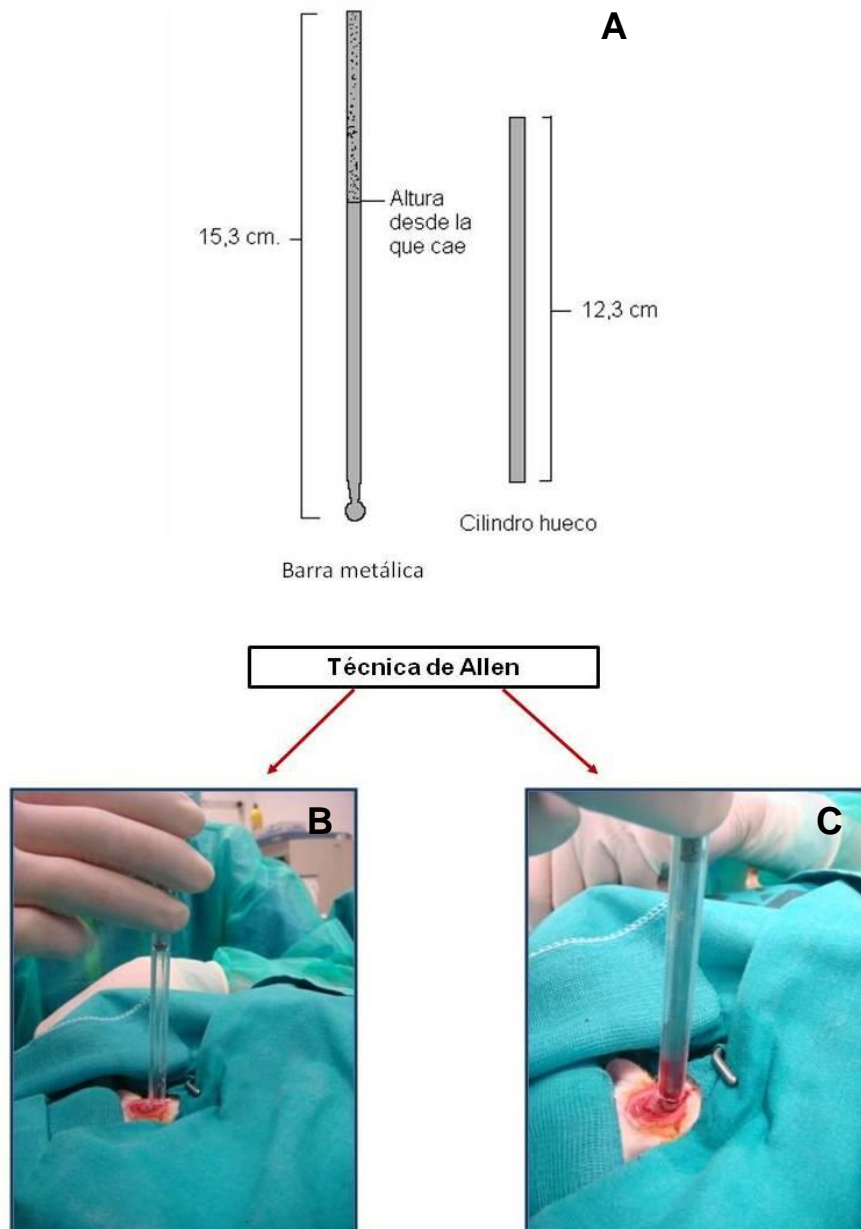


**Figura 8:** **A**, realización de la incisión quirúrgica sobre la línea media de la cabeza de la rata; **B**, exposición del campo quirúrgico donde se localiza el hueso parietal derecho; **C**, realización de la craneotomía entre las suturas craneanas lambda y bregma; y **D**, exposición del tejido cerebral una vez realizada la craneotomía.

Se realizó una incisión de 1 cm de longitud en la línea media de la cabeza. Una vez abierto el campo quirúrgico, se realizó una craneotomía de 10 mm de diámetro sobre el hueso parietal derecho del cráneo, entre las suturas lambda y bregma (**Figura 8**).



Tras la exposición de la dura madre cortical, se procedió a abrir una ventana en ella con el fin de mostrar el aracnoides, para ello se recortó la dura madre por medio de unas tijeras de microcirugía bajo microscopio quirúrgico para no dañar los vasos ni el tejido blando subyacente.



**Figura 9:** Técnica de Allen (Allen, 1911): **A**, componentes necesarios para realizar una lesión cerebral traumática en ratas y realización de la técnica quirúrgica donde se muestra el antes (**B**) y después (**C**) de dejar caer el peso sobre el cerebro.



Para el presente estudio se ha desarrollado un modelo de traumatismo adaptado de un protocolo descrito por Allen en 1911, la *Técnica de Allen*, que consiste en dejar caer un peso conocido desde una altura también determinada para inducir lesiones medulares en modelos experimentales. Posteriormente esta técnica fue adaptada por nuestro laboratorio para el estudio de lesiones traumáticas medulares en ratas Wistar adultas (Zurita et al, 2006), a partir de donde fue utilizada para producir lesiones cerebrales traumáticas (Bonilla et al, 2009b). La lesión traumática cerebral resultante de la *Técnica de Allen* es similar a la que se encuentra cuando se realiza a través del CCI (Dixon et al, 1991), es un tipo de lesión focal que produce destrucción de la sustancia gris y de la sustancia blanca subyacente (**Figura 9**).

Se produjo la lesión cerebral traumática dejando caer, desde una altura de 15 cm sobre la superficie del cerebro una barra de 12 mm de diámetro y 25 g de peso. Esta barra fue guiada en su caída a través de un cilindro hueco, adaptado al área de la craneotomía, que permite realizar una lesión estandarizada (**Figura 9-B y C**). En todos los animales experimentales se observaron daños característicos de una lesión traumática cerebral inmediatamente después de despertar tras la realización de la cirugía.

## 2.2. VALORACIÓN FUNCIONAL

La lesión cerebral sobre el área motora y sensorial en la rata produce una serie de deficiencias como son, por ejemplo, pérdida del equilibrio y de la coordinación, disminución de la sensibilidad y de la fuerza en el lado contralateral a la lesión (lado izquierdo),...Para valorar la lesión cerebral crónica de los animales previamente lesionados, se realizó el seguimiento de las funciones neurológicas de los mismos durante los dos meses siguientes a la realización del traumatismo cerebral a través de dos test:

- Escala de valoración sensitivo-motora.
- Rotarod: coordinación y equilibrio.

	<b>Escala de valoración sensitivo-motora</b>	<b>Puntos</b>
<b>Test motor</b>	Levantando la rata por el rabo	<b>1</b>
	- Flexión de los miembros traseros	<b>1</b>
	- Flexión de los miembros delanteros	<b>1</b>
	- El animal está rotado	<b>1</b>
	Situando la rata en el suelo	<b>0</b>
	- Camina normal	<b>1</b>
	- Inhabilidad para caminar recto	<b>2</b>
	- Circular hacia el lado parético (derecho)	<b>2</b>
<b>Test sensorial</b>	Test de orientación ( Visual y Táctil )	<b>1</b>
	Test propioceptivo ( sensibilidad profunda)	<b>1</b>
<b>Test del equilibrio en la viga</b>	Mantener el equilibrio con postura firme	<b>0</b>
	Agarrarse al costado de la viga	<b>1</b>
	Abrazado a la viga y 1 de los miembros cae de la viga	<b>2</b>
	Abrazado a la viga y 2 de los miembros caen de la viga, o gira en la viga (>60 Seg)	<b>3</b>
	Conseguir el equilibrio en la viga pero cae fuera (>40 Seg)	<b>4</b>
	Conseguir el equilibrio en la viga pero cae fuera (>20 Seg)	<b>5</b>
	Caer fuera; no consigue el equilibrio o queda colgado de la viga (< 20 Seg)	<b>6</b>
<b>Ausencia de reflejos</b>	Reflejo pinna ( Sacudida de cabeza cuando estimulamos el pabellón auditivo)	<b>1</b>
	Reflejo corneal ( Parpadeo del ojo cuando lo rozamos con un algodón )	<b>1</b>
	Reflejo Susto ( Respuesta motora cuando hacemos ruido con las palmas de las manos )	<b>1</b>
	Inmovilidad y mirada fija	<b>1</b>
	Temblor (Sacudida de perro mojado)	<b>1</b>
	Irritabilidad, crisis epilépticas, clonus y mioclonos (espasticidad)	<b>1</b>
	<b>Puntuación máxima</b>	<b>19</b>

**Tabla 6:** Escala de valoración neurológica generada a partir de escalas previamente descritas en la literatura y que consta de medidas de valoraciones de la función motora, sensorial, test de equilibrio de la viga y medida de ausencia de reflejos

Los test se realizaron 3 veces antes del trauma cerebral experimental (una vez al día 3 días antes de la lesión), con el fin de establecer los valores basales de los animales, posteriormente se fue realizando un seguimiento dos veces por semana durante los dos meses que siguen al desarrollo de la lesión cerebral. El trasplante se realizó transcurridos esos dos primeros meses a partir de donde se volvió a realizar un seguimiento dos veces por semanas, hasta transcurridos un total de 4 meses tras el trauma y dos meses tras el trasplante o el tratamiento control.

#### a) Escala de valoración sensitivo-motora

La Escala de valoración sensitivo-motora utilizada fue desarrollada basándose en una serie de escalas descrita previamente en la literatura pero a las que se les añadió algunas modificaciones (Chen et al, 2001b; Mahmood et al, 2001a). Dicho test modificado cuenta con una serie de valoraciones que abarca la función motora (estado muscular, movimientos anormales), sensorial (visual, táctil y propioceptivo) y test de equilibrio de la viga. La función neurológica fue valorada de 0 a 19 puntos (puntuación normal 0, puntuación de déficit máximo 19) (**Tabla 6**).



**Figura 10:** Medida del déficit motor a través del Rota-Rod donde se muestra en la figura **A**, un grupo de animales sin ningún tipo de lesión y en las figuras **B** y **C**, animales a los que se les ha producido el daño cerebral.

**a) Rotarod:**

La coordinación y el equilibrio fue medido con el Rota-Rod (Mahmood et al, 2002), que aparece descrito en la literatura como un método clásico de medir lesiones cerebrales en animales de experimentación (**Figura 10**).

El Rota-Rod consta de un rodillo sobre el que se coloca el animal, que acelera progresivamente de 4 a 40 cm<sup>2</sup>/s durante un minuto. Los animales con lesiones cerebrales obtienen menos puntuación que los animales sanos, y la puntuación irá aumentando según sea más leve el grado de lesión.

### **3. TERAPIA CELULAR CON CMM EN LESIONES TRAUMÁTICAS CEREBRALES**

#### **3.1. CULTIVO DE CMM**

**a) Obtención de las CMM**

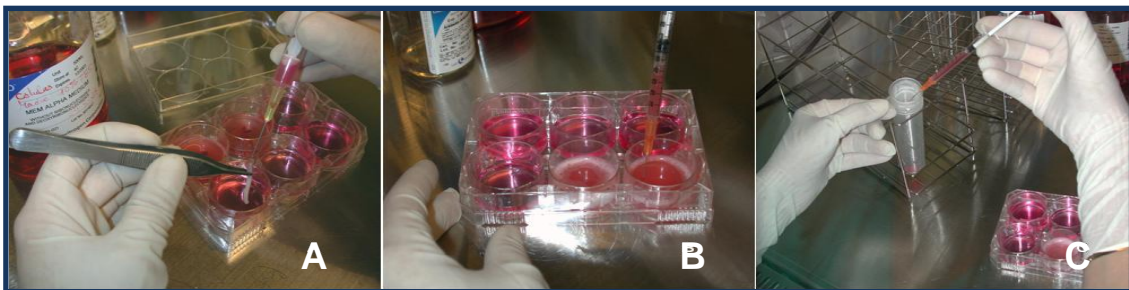
Para la obtención de las CMM se utilizaron ratas Wistar macho (Charles River Laboratories International, Inc) de entre 200 y 250 g de peso. Para obtener el tejido donante para la extracción de las CMM la anestesia fue inducida situando a los animales en una cámara de anestesia con un flujo de oxígeno de 3 L/min y 8% de sevoflurane. Posteriormente fueron colocados en la mesa de cirugía, donde la anestesia se les administró a través de una mascarilla con un flujo constante de 5% de sevoflurane y 2 L/min de oxígeno, durante el proceso de extracción de las muestras las ratas respiraban espontáneamente.

Se aislaron las tibias y los fémures, siendo inmediatamente colocados en medio alfa-MEM (Lonza Group Ltd, Switzerland)/2,5% suero fetal bovino (FBS, Lonza) suplementado con antibiótico (Lonza) a una temperatura constante de 37°C. Tras finalizar el proceso de extracción de las muestras, los animales,

que seguían recibiendo el flujo anestésico, fueron sacrificados con una inyección intracardiaca de cloruro potásico.

Las muestras fueron llevadas a laboratorio e introducidas bajo campana de flujo laminar para su inmediato procesamiento para la obtención de las CMM. Una vez bajo campana, la temperatura de las muestras se mantuvo constante, para ello se sumergieron en alfa-MEM/2,5% FBS suplementado con antibiótico en placas p60 colocadas sobre una superficie con control de temperatura que se mantuvo constantemente a 37°C durante todo el proceso.

Una a una, las epífisis de los huesos fueron punzadas con una aguja del nº 20, por donde posteriormente se procedió a lavar las diáfisis con una jeringuilla y una aguja del nº 20 cargada con 2 ml de medio alfa-MEM completo, es decir, suplementado con 2 mM de L-glutamina (Lonza), 100 u/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, y sin deoxiribonucleótidos ni ribonucleótidos y con 20% FBS. Posteriormente, las células de la médula ósea se disgregaron mediante pipeteado y se filtraron a través de una malla de nylon de 70 µm (**Figura 11**).



**Figura 11:** Obtención de las CMM del estroma de la médula ósea de ratas macho, dónde se muestra en la figura **A**, el lavado de las diáfisis con medio alfa-MEM completo/20%FBS, en la figura **B** se muestra la disgregación mecánica de la médula ósea obtenida y en la **C** el filtrado de la suspensión celular a través de una malla de nylon de 70 µm.

La suspensión celular resultante fue sometida a recuento en cámara de Neubauer mediante el test de viabilidad del azul tripán. Tras el mismo, las células se cultivaron en frascos de 75 cm<sup>2</sup> a una concentración 160.000

células/cm<sup>2</sup> en presencia de 20 ml de medio alfa-MEM completo/20%FBS, en una estufa a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.

A las 72 horas de incubación el sobrenadante fue retirado y sustituido por medio nuevo, ya que las CMM son conocidas por su capacidad de crecer adheridas al plástico en contra del resto de los tipos celulares de la médula ósea. Tras realizar una serie de cambios de medio, prácticamente todas las células que quedan en el cultivo son CMM (Friedenstein et al, 1976).

### **b) Mantenimiento de los cultivos de CMM**

Cuando las células alcanzaron un desarrollo cercano a la confluencia, éstas fueron levantadas del frasco de cultivo. Una vez retirado el medio de cultivo, los frascos fueron lavados 2 veces con buffer fosfato (PBS) 1X. Una vez retirado el PBS 1X se procedió a su incubación con 2 ml de tripsina 0.25%/1mM EDTA (Lonza) durante 4-5 minutos a 37°C. Tras este periodo de incubación la tripsina fue inactivada con 6 ml de medio alfa-MEM completo/2,5% FBS, y los frascos fueron posteriormente lavados de nuevo con 6 ml de medio alfa-MEM completo/2,5% FBS. Las células obtenidas, tras ser centrifugadas a 1200 rpm durante 15 minutos, fueron lavadas con 20 mL de medio alfa-MEM completo/2,5%FBS mediante centrifugación a 1200 rpm durante 5 minutos cada lavado. Finalmente el botón celular obtenido fue diluido en medio alfa-MEM completo/10%FBS y sometido a recuento nuevamente mediante el test de viabilidad de azul tripán. Una vez conocido el número de células madre, éstas fueron subcultivadas en frascos de 75 cm<sup>2</sup> en una concentración 15.000 células/cm<sup>2</sup> en presencia de 12 ml de medio alfa-MEM completo/10% FBS.

### **c) Preparación de las CMM para los trasplantes**

Para obtener el material donante para el trasplante celular, células correspondientes a un primer pase (P1) se levantaron en condiciones estériles y bajo campana de flujo laminar. Una vez retirado el medio de cultivo, los frascos fueron lavados 2 veces con PBS 1X. Una vez retirado el PBS 1X se procedió a su digestión enzimática con 3 ml de tripsina 0.25%/1mM EDTA

durante 4-5 minutos a 37°C. Tras este periodo de incubación la tripsina fue inactivada con 6 ml de medio alfa-MEM completo/2,5% FBS y los frascos fueron posteriormente lavados de nuevo con 6 ml de medio alfa-MEM completo/2,5% FBS. Las células obtenidas, tras ser centrifugadas a 1200 rpm durante 15 minutos, se lavaron con suero fisiológico y se sometieron a recuento celular mediante el test de viabilidad del azul tripán. Una vez realizado el recuento,  $3 \times 10^6$  CMM fueron nuevamente centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos. Finalmente el botón celular obtenido fue diluido en suero fisiológico al volumen requerido para el trasplante, aproximadamente 30  $\mu$ L, y cargadas en una jeringuilla Hamilton de 50  $\mu$ l, en condiciones estériles y bajo campana de flujo laminar.

#### **d) Caracterización fenotípica de las CMM**

Se desarrollaron técnicas de citometría de flujo para poder caracterizar fenotípicamente los cultivos purificados de la médula ósea de las ratas macho donantes.

Una vez levantados los cultivos, tal como se indica en el apartado anterior, una pequeña muestra de células fue derivada para realizar el correspondiente estudio fenotípico. Para el análisis de citometría las células fueron separadas con tripsina y marcadas con anticuerpos primarios conjugados con fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) o Alexa 647. Los siguientes marcadores de superficie celular se utilizaron para caracterizar las células en cada pase: CD11b, CD29, CD31, CD45 y CD90 con el apropiado control isotípico conjugado con un fluorocromo (todos los anticuerpos de AbD Serotec, Oxford, UK), cada anticuerpo es específico de marcadores en rata.

Se realizó un protocolo estándar de manejo para marcar las CMM. Se resuspendieron  $10^6$  células mililitro en Running Buffer (RB; Miltenyi Biotec GmbH, Gladbach, Germany) y se incubaron con el anticuerpo primario (1:10, v/v) durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente las células se lavaron con RB y se centrifugaron durante 7 minutos a 4°C, el pellet resultante se resuspendió nuevamente en 0.5 mL de RB. Para detectar las células muertas y poder así

eliminarlas del estudio se añadió 5  $\mu$ L de Ioduro de propidio (Southernbiotech, Birmingham, AL, USA) en todos los experimentos realizados. El análisis de citometría se realizó en un citómetro Cytomics FC500 MPL, los resultados obtenidos se analizaron con CFC 500MXP, version 2.2 (Beckman Coulter Inc.; Miami, FL, USA). Las diferentes poblaciones celulares de los cultivos de CMM fueron identificadas basándose en diagramas de tamaño/complejidad (forward/side scatter; FSC/SSC). Los cultivos de células típicamente mesenquimales deben expresar  $\geq 95\%$  de CD29 y CD90; y deben tener una expresión  $\leq 5\%$  de CD11b, CD45 o CD31. Las colecciones de datos adquiridos se analizaron con el software CXP (version 2.1; Beckman Coulter Inc).

Sólo las CMM que permanecieron menos de 5 semanas en cultivo y con características fenotípicas típicas de CMM con una viabilidad mayor de un 95% se utilizaron para realizar los diferentes tratamientos (**Tabla 7**).

	<b>CMM</b>
<b>Tiempo en cultivo</b>	$\leq 5$ semanas en cultivo
<b>Características fenotípicas</b>	Expresión $\geq 95\%$ : CD29 y CD90 Expresión $\leq 5\%$ : CD11b, CD45 o CD31
<b>Viabilidad</b>	$\geq 95\%$

**Tabla 7:** Criterios de selección de las CMM utilizadas para realizar los estudios de terapia celular.

### 3.2. TRASPLANTE

Para poder comprobar la posible utilidad del trasplante de CMM en el tratamiento del daño cerebral crónico se desarrollaron los siguientes grupos experimentales:

- Grupo A (n=10): Trasplante intralesional de las CMM resuspendidas en suero fisiológico.



- Grupo B (n=10): Trasplante intralesional simplemente de suero fisiológico.

Trascurridos 2 meses del desarrollo del trauma cerebral, todas las ratas fueron anestesiadas con un flujo de oxígeno continuo de 3 L/min y 8% de sevoflurane y premedicadas con morfina (2.5 mg/kg, s.c.) y meloxicam (2 mg/kg, s.c.). La anestesia se mantuvo mediante sevoflurane al 2% y 3 L/min de oxígeno, durante la cirugía las ratas respiraban espontáneamente. Se procedió a abrir una ventana sobre la misma zona donde 2 meses antes se había realizado la craneotomía con el fin de exponer la cavidad post-traumática. Una vez realizada la abertura del campo quirúrgico los trasplantes se desarrollan según el grupo experimental correspondiente.

A diez ratas hembras Wistar adultas se les trasplantan intralesionalmente  $3 \times 10^6$  CMM, las cuales fueron procesadas como se indica en el apartado anterior **3.1.c)**, y diez ratas recibieron el trasplante intralesional de 30  $\mu$ l de suero fisiológico como control.

#### 4. ESTUDIO HISTOLÓGICO

A los dos meses de recibir el tratamiento correspondiente a cada grupo (4 meses después del trauma cerebral), las ratas fueron anestesiadas con sevoflurane al 4% en un flujo de oxígeno de 3 L/min, y perfundidas transcardialmente con una solución de 10 mL de suero salino con heparina, seguido por 100 mL de paraformaldehído al 4 % en una solución de PBS 1X, pH 7,4.

Una vez extraídos los cerebros fueron post-fijados en la misma solución de paraformaldehído durante 12 horas a 4°C. Posteriormente, fueron procesados siguiendo las técnicas convencionales histológicas de inclusión en parafina. Para ello se dividieron sagitalmente por la mitad, de modo que el hemisferio lesionado y el contralateral quedaron separados. Tras ser lavados y deshidratados en una serie creciente de alcoholes se sumergieron en parafina

a 55°C 24 horas. Pasado el tiempo se formaron dos bloques de tejido por cerebro (uno por hemisferio), los cuales fueron procesados a través de un microtomo convencional de forma seriada en cortes de 5 µm. Cada 10 cortes histológicos se realizó una Hematoxilina-Eosina (H-E), como tinción control del tejido, para poder detectar diferencias histológicas según el tratamiento administrado.

#### 4.1. CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

En el presente estudio, la caracterización inmunohistoquímica de la zona de la lesión se realizó mediante la utilización de diferentes marcadores celulares.

##### a) Procedimiento general.

Cinco cortes separados entre sí 20 µm de cada bloque de parafina fueron desparafinados en Xilol seguido por una serie decreciente de alcoholes hasta agua. Una vez lavadas las secciones con PBS, se colocaron en un buffer citrato salino (pH: 6) (en aquellos casos en los que era necesario) que fue llevado a la ebullición en un microondas durante 10 minutos. Después de enfriarse a temperatura ambiente, los cortes se trataron con 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 30 minutos para inactivar la actividad de la peroxidasa endógena.

#### PROCEDIMIENTO GENERAL INMUNOHISTOQUÍMICA

Anticuerpos primarios (Anti-proteína específica)	Suero bloqueante	Desenmascaramiento antigénico	Anticuerpo secundario
<b>Dcx (Doblecortina)</b>	RABBIT	NO NECESITA	Biotilylated Anti-goat IgG
<b>Ki-67</b>	GOAT	CITRATO SÓDICO	Biotinylated Anti-rabbit IgG Cy <sup>TM</sup> 2 anti-rabbit IgG
<b>Nestina</b>	HORSE	NO NECESITA	Biotinylated Anti-mouse IgG
<b>NF-200</b>	HORSE	NO NECESITA	Biotinylated Anti-mouse IgG TRICT anti-mouse IgG
<b>Neu-N</b>	GOAT	CITRATO SÓDICO	Cy <sup>TM</sup> 2 anti-mouse IgG
<b>MAP-2</b>	HORSE	NO NECESITA	Biotinylated Anti-mouse IgG
<b>PGFA</b>	HORSE	NO NECESITA	Biotinylated Anti-mouse IgG Cy <sup>TM</sup> 2 anti-mouse IgG

**Tabla 8:** Reactivos generales usados en el desarrollo de la técnica inmunohistoquímica.

Antes de la incubación con el anticuerpo primario, los lugares de unión no-específicos fueron bloqueados durante una hora con suero normal 3% correspondiente a la especie en la que el anticuerpo secundario fue generado. El anticuerpo primario se añadió directamente tras quitar el exceso de suero bloqueante y fue incubado toda la noche a 4°C. Tras lavar el primario con PBS, las secciones se incubaron con un anticuerpo secundario acorde con el anticuerpo primario utilizado conjugado con biotina.

Finalmente el anticuerpo secundario se lavó con PBS y se reveló utilizando la técnica ABC para estudio con microscopía de luz convencional. En cada serie se realizaron controles del anticuerpo primario y del secundario, los cuales consistieron en realizar la técnica completa sustituyendo el anticuerpo primario o el secundario por PBS.

#### **b) Marcadores específicos.**

Los reactivos generales usados en el desarrollo de la técnica inmunohistoquímica se muestran en el **Tabla 8**, mientras que las características concretas de cada uno de ellos se muestran en el **Tabla 9**. A continuación se describen detalladamente los estudios histológicos desarrollados:

##### **a. Estudio de marcadores neuronales y gliales**

Para poder comprobar cómo el trasplante de las CMM en el tejido cerebral puede relacionarse con la expresión de marcadores neurales y gliales se estudió la expresión de:

- MAP-2 (Proteína 2 asociada a microtúbulo): marcador citoplasmático de neuronas maduras.
- Proteína gliofibrilar ácida (PGFA): proteína fibrosa que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular, en particular de células gliales como los astrocitos y células de Schwan.

## REACTIVOS ESPECÍFICOS

<b>Anticuerpos primarios (Anti-proteína específica)</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Concentración de uso</b>
<b>Dcx (Doblecortina)</b>	Santa Cruz Biothecnology, Inc.	1:200
<b>Ki-67</b>	LabVision Westinghouse, Dr Fremont, CA, USA	1:200
<b>Nestina</b>	MILLIPORE (Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA)	1:200
<b>Neu-N</b>	Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA	1:500
<b>NF-200</b>	AbD Serotec	1:100
<b>MAP-2</b>	Chemicon International Inc, Temecula, CA, USA	1µg/ml
<b>PGFA</b>	LabVision Westinghouse, Dr Fremont, CA, USA	1µg/mL
<b>Anticuerpos secundarios</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Concentración de uso</b>
<b>Anti-biotin mouse IgG</b>	Jackson Immunoreseach Laboratories, Inc.	1:200
<b>Biotinylated Anti-mouse IgG</b>	Vector Laboratories Inc, CA, USA	5µg/ml
<b>Biotinylated Anti-mouse IgG</b>	Jackson Immunoreseach Laboratories, Inc.	1:200
<b>Biotinylated Anti-rabbit IgG</b>	Jackson Immunoreseach Laboratories, Inc.	1:200
<b>Biotinylated Anti-GOAT IgG</b>	Vector Laboratories Inc, CA, USA	1:200
<b>Cy™ 2 anti-rabbit IgG</b>	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore Pike, USA	1:200
<b>TRICT anti-mouse IgG</b>	Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Baltimore Pike, USA	1:200
<b>Suero bloqueante</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Concentración de uso</b>
<b>Suero Goat</b>	Vector Laboratories Inc, CA, USA	5%
<b>Suero Horse</b>	Vector Laboratories Inc, CA, USA	5%
<b>Suero Rabbit</b>	Vector Laboratories Inc, CA, USA	5%

**Tabla 9:** Características concretas de cada uno de los reactivos utilizados en la realización de la técnica inmunohistoquímica.

### **b. Estudio de la neurogénesis**

Para poder comprobar la utilidad del trasplante de CMM como mecanismo de activación de la neurogénesis endógena se estudió:

- Nestina: filamento intermedio típico de células precursoras nerviosas. Marca la terminación del ciclo celular y el inicio de la diferenciación.

Para poder analizar la expresión de Nestina, 3 cortes separados entre sí 40  $\mu\text{m}$  fueron seleccionados de cada animal. El número total de células Nestina<sup>+</sup> en la zona de lesión o de la zona subventricular (ZSV) fue contado de cada corte histológico a 400x, tomándose como valor final la media de los tres cortes.

### **c. Estudio de la proliferación**

Para poder analizar la actividad proliferativa se estudió la expresión de Ki-67 en el tejido cerebral:

- Ki-67: marcador nuclear de células en proliferación; la proteína ki-67 está presente durante las fases activas del ciclo celular ( $G_1$ , S,  $G_2$ , y mitosis), pero está ausente en la fase estacionaria del ciclo ( $G_0$ ).

De 3 cortes separados entre sí 40  $\mu\text{m}$  se contó el número total de células Ki-67<sup>+</sup> en la zona de lesión y de la ZSV a 40x, tomándose como valor final la media de los tres cortes.

### **c) Detección de la neurogénesis y de la proliferación:**

Algunos cortes fueron sometidos a un doble marcaje por inmunofluorescencia con el fin de detectar la co-expresión de Nestina y Ki-67. Las secciones histológicas fueron incubadas con dos anticuerpos secundarios combinados con dos fluorocromos diferentes para su posterior identificación, Cy<sup>TM</sup> 2 anti-rabbit IgG y TRICT anti-mouse IgG, durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS los cortes fueron nuevamente incubados con 4' 6-

diamidino-2-phenylindole dichlorhydrate (DAPI) (Merck KgaA, Darmstadt, Alemania) y montados con glicerol.

#### **4.2. HIBRIDACIÓN IN SITU: Detección del gen Sry del cromosoma Y**

Una vez terminado el estudio de valoración funcional y tras eutanasiar a los animales, la localización de las células en la zona de lesión se realizó a través de una Hibridación In Situ con el fin de localizar las células procedentes de las ratas macho donantes de las que se extrajo la médula ósea. Para ello se utilizó una sonda de DNA contra la región Sry del Cromosoma Y murino, que es aquella encargada de la determinación del sexo en los roedores, y que se encuentra marcada en su extremo 5' con biotina.

Tres cortes separados entre sí 30 µm de cada bloque (conteniendo el hemisferio derecho del cerebro, es decir, aquel en el que se realizó la lesión y los tratamientos) fueron desparafinados en Xilol seguido por una serie decreciente de alcoholes hasta agua. Posteriormente se incubaron las muestras en HCl 0.2M. Tras lavar las muestras con PBS se acetiló el tejido con Tiocianato sodico 7% (Sigma-Aldrich®) durante 10 minutos a 80°C. Una vez lavado con PBS se incubó nuevamente la muestra en Proteinasa-K 50 µgr/ml (Sigma-Aldrich®) durante 15 minutos a 37 °C tras lo cual se lavó nuevamente con PBS y se post-fijaron las preparaciones con paraformaldehido 4% en PBS (pH: 7,4). Una vez fijadas las muestras fueron nuevamente lavadas con PBS 1X.

Antes de proceder a la hibridación se incubaron las preparaciones durante 5 horas a temperatura ambiente en una mezcla de prehibridación consistente en Formamida desionizada 50% (Sigma-Aldrich®), Denhart 5X (Sigma-Aldrich®), SSC 2X (SSC 20X, BioRad Laboratories, Inc). Transcurrido el tiempo se retiró el exceso de mezcla de prehibridación y se añadió el de hibridación, el cual consta de los mismos elementos pero al que se le añade también Dextran sulfato 10% (Sigma-Aldrich®), DNA Salmon 200 µg/ml (Sigma-Aldrich®) y la sonda a una concentración final total de 400 ngr. Una vez cubiertas con un

cubreobjeto y selladas las muestras se desnaturalizaron a 80°C durante 5 minutos, se dejaron enfriar en hielo y se hibridaron toda la noche a 50°C. Al día siguiente se retiraron los cubreobjetos y se lavaron con SSC 2X. Posteriormente se incubaron con Formamida desionizada al 50% en SSC 2X. Una vez lavadas las muestras con SSC 2X se sumergieron en una solución detergente durante 10 minutos.

La sonda biotinilada fue visualizada a través de una inmunofluorescencia, usando un anticuerpo primario anti-biotina mouse IgG (1:100, Jackson) y un anticuerpo secundario conjugado con Rhodamine (TRICT anti-mouse IgG (1:200, Jackson). Los cortes fueron incubados con 4' 6-diamidino-2-phenylindole dichlorhydrate (DAPI)(Merck) y montados con glicerol. Se realizaron controles negativos donde la sonda no fue añadida al mix de hibridación y controles positivos donde la hibridación se realizó sobre cerebros de ratas macho.

#### **a) Expresión de marcadores neuronales y gliales de las CMM trasplantadas**

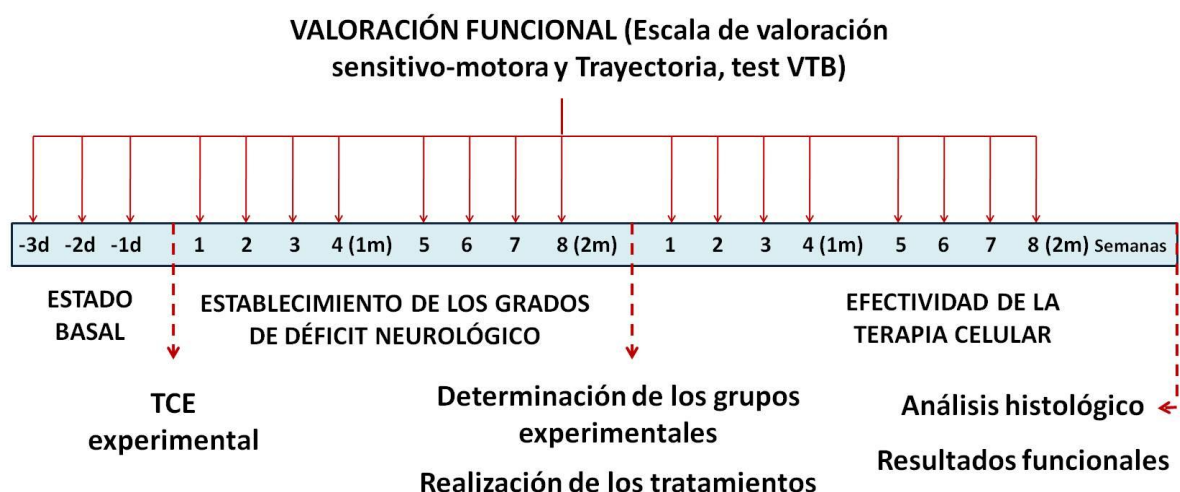
Algunos cortes histológicos fueron sometidos a un doble marcaje para intentar visualizar la posible co-localización del gen Sry junto con el marcador neuronal Neu-N o el marcador astrogial PGFA. Cada sección sagital fue primero tratada para la posible detección del gen Sry como se describe en el apartado **4.2**.

Una vez finalizada la Hibridación In Situ, se incubó la muestra con un anticuerpo primario anti-Neu-N mouse IgG o anti-PGFA mouse IgG toda la noche a 4°C. Tras lavar las muestras se incubó nuevamente durante una hora con un anticuerpo secundario conjugado con Cy<sup>TM</sup> 2 anti-mouse IgG (1:200, Jackson). Los cortes fueron incubados con 4' 6-diamidino-2-phenylindole dichlorhydrate (DAPI) (Merck) y montados con glicerol. Se realizaron controles negativos y positivos.

**PARTE II:****EFICACIA DE LA TERAPIA CELULAR EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE LESION TRAUMÁTICA CEREBRAL CRÓNICA****1. PROCEDIMIENTO GENERAL**

El procedimiento realizado en la segunda parte del presente trabajo sigue un desarrollo similar al descrito en la PARTE I pero con algunas consideraciones significativas en cuanto al número de animales utilizado.

El número total de animales necesario para poder determinar la eficacia de la terapia celular en función del nivel de lesión cerebral se estableció en principio en 50 animales, aunque el número real utilizado se determinó en función de la capacidad de los animales de sobrevivir y de ser independientes una semana después de la realización del trauma cerebral experimental, siendo finalmente 62 ratas. Una vez que los animales alcanzaron la fase crónica fueron clasificados en función de su grado de lesión, y distribuidos aleatoriamente para establecer los grupos experimentales para recibir los diferentes tratamientos. En la **Figura 12** se muestra la cronología de los experimentos.



**Figura 12:** Cronología de los experimentos realizados para la realización de la PARTE II del presente trabajo. Primero, obtención de la valoración basal de los animales seguida de la realización del TCE experimental. Segundo, establecimiento de los niveles de déficit neurológico y tercero, estudio de la efectividad de la terapia celular en función del nivel de lesión cerebral a través del análisis de las muestras histológicas y de los resultados funcionales.



El desarrollo de la segunda parte del presente trabajo se realizó en diferentes fases:

1. Establecimiento de una serie de criterios para detectar diferentes niveles de lesión neurológica dentro de un modelo de lesión traumática cerebral en ratas Wistar adultas, a través del uso de test de valoración neurológica.
2. Determinar si la efectividad de las terapias celulares con CMM se ve comprometida con el nivel de deterioro de la función neurológica dentro de dicho modelo de lesión cerebral traumática crónica en ratas Wistar adultas.
3. Estudio sobre el tejido cerebral de la posible influencia de la terapia celular en función del nivel de lesión y el tratamiento administrado.

## **2. NIVELES DE DÉFICIT NEUROLÓGICO**

### **2.1. MODELO ANIMAL**

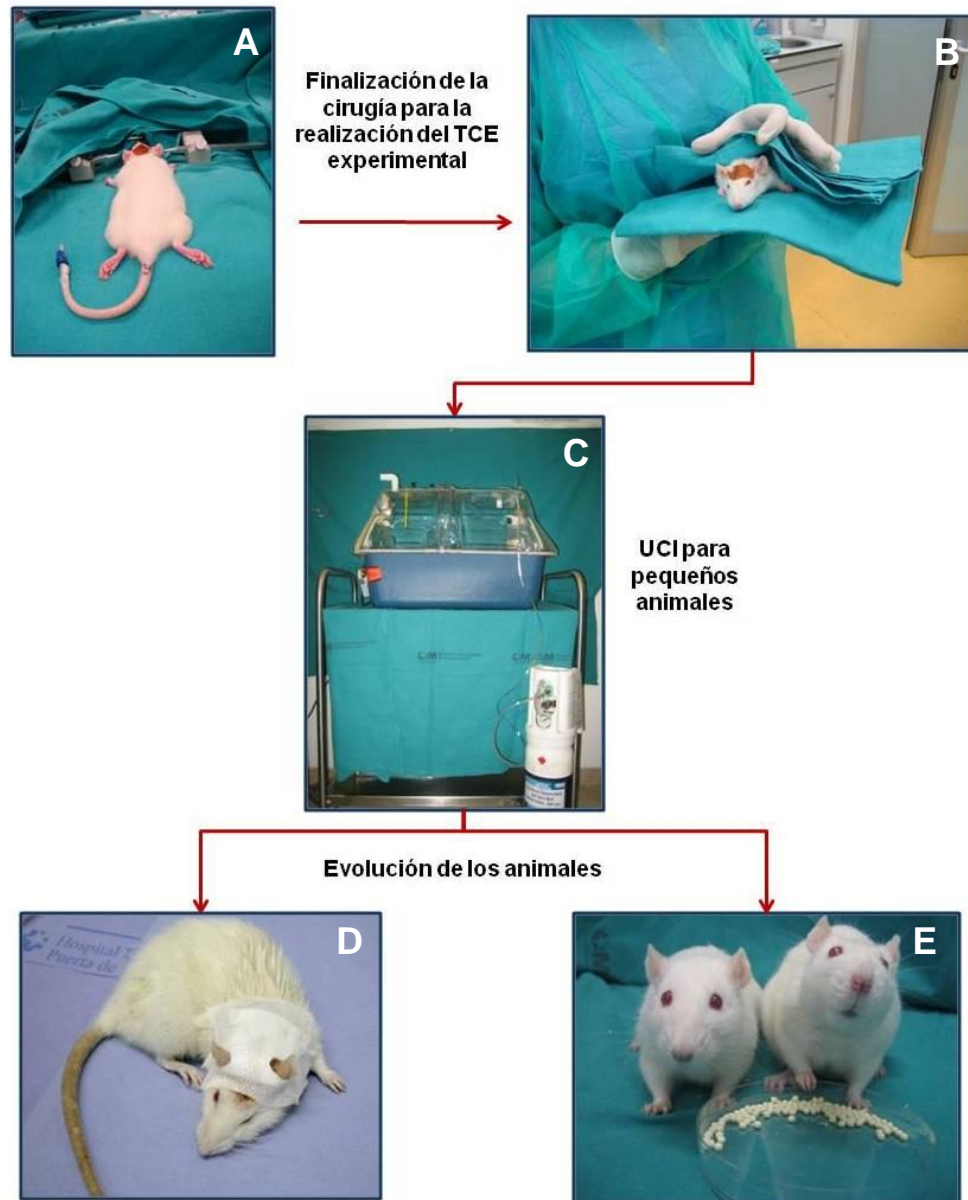
#### **a) Realización de la lesión cerebral traumática para conseguir diferentes niveles de lesión cerebral crónica**

La realización de la lesión cerebral traumática se desarrolló tal y como se describe en el apartado **2.1.** de la PARTE I. Pero para tratar de aumentar al máximo la supervivencia de aquellos animales que presentan una lesión cerebral grave se añadieron una serie de modificaciones al modelo de lesión cerebral traumática anteriormente descrito y que se describen a continuación.

#### **b) Cuidados de animales con lesión cerebral grave**

Con el fin de intentar aumentar al máximo la supervivencia de los animales con lesiones cerebrales graves para abarcar el máximo posible de diferencias en los distintos niveles de déficit neurológico, se desarrolló un exhaustivo protocolo de cuidados pre, intra y post-operatorios de los animales empleados.

Alguno de los puntos ya se han desarrollado anteriormente y el resto se realizó los días siguientes a la realización de la cirugía de TCE experimental.



**Figura 13:** Modificaciones realizadas sobre el modelo de lesión traumática cerebral anteriormente descrito para aumentar la supervivencia de los animales con lesión cerebral grave: **A**, mantenimiento de la vía venosa periférica a través de un obturador; **B** y **C**, colocación de las ratas operadas en una UCI de pequeños animales; **D** y **E**, animales dos meses tras la realización del trauma cerebral experimental.

Al finalizar la parte quirúrgica del modelo experimental de lesión cerebral traumática se añadieron los siguientes aspectos:

- Se medicó a los animales intravenosamente con Diazepam (0,5 mg/kg) para prevenir posibles crisis epilépticas.
- Se les retiró la hidratación, pero se mantuvo la vía venosa por medio de un obturador aproximadamente unas 24 horas tras la cirugía hasta comprobar la evolución de los animales (**Figura 13-A**).
- Los animales fueron colocados en una cámara con temperatura y humedad controladas, realizándose cuidados postoperatorios específicos y procedimientos diarios de vigilancia (**Figura 13-B y C**).

En la **Tabla 10** se muestra un resumen del protocolo de cuidados de ratas con lesión cerebral traumática desarrollado y que se agrupa en 2 puntos fundamentalmente:

- Medidas preventivas: administrados a todos los animales del estudio.
  - Cuidados pre-operatorios.
  - Cuidados intra-operatorios.
- Cuidados post-operatorios:
  - Administrados a todos los animales del estudio durante las primeras 48 horas.
  - Administrados hasta 7 días post-TCE a aquellos animales con lesión cerebral grave que no son capaces de sobrevivir por sí mismos, momento en el que si no son independientes serán eutanasiados.

Con este modelo experimental, logramos producir una lesión cerebral grave. Durante el transcurso de los dos meses siguientes a la realización del trauma los animales no mostraron signos de recuperación funcional espontánea (**Figura 13-D y E**), momento en que se llevó a cabo el presente estudio.

	Pauta	Administración	Finalidad
<b>Cuidados pre-operatorios (24h pre-TCE)</b>	Fenitoína	5 mg/kg intravenosos, en 1 dosis	Prevención de crisis epilépticas
<b>Cuidados intra-operatorios</b>	Ringer-lactato	2 mL intravenosos en un flujo continuo durante toda la cirugía	Hidratación
	Diazepam	0,5 mg/kg intravenosos, en 1 dosis	Prevención de crisis epilépticas
<b>Cuidados post-operatorios (hasta 1 semana post-TCE)</b>	Colocación de los animales en UCI	Hasta 7d post-TCE	
	Mantenimiento de la vía venosa periférica	Hasta 7d post-TCE (cambiando el catéter cada 48h).	Aumentar al máximo la supervivencia de aquellos animales con lesión cerebral grave hasta que aprendan/recuperen la capacidad de beber por sí mismos.
	Ringer-lactato	2 mL intravenosos 3 veces al día hasta 7d post-TCE	
	Hidratación oral	3 mL de agua o suero oral 3 veces al día hasta 7d post-TCE.	
	Papillas hiperproteicas	2 mL 3 veces al día hasta 7d post-TCE	Aumentar al máximo la supervivencia de aquellos animales con lesión cerebral grave hasta que aprendan/recuperen la capacidad de comer por sí mismos.
	Diazepam	0,5 mg/kg intravenosos, en 1 dosis	Tratamiento de crisis epilépticas cada vez que tengan lugar.

**Tabla 10:** Cuidados pre, intra y post-operatorios realizados para aumentar la supervivencia de los animales con lesión cerebral traumática.

## **2.2. VALORACIÓN FUNCIONAL PARA DETECTAR NIVELES DE LESIÓN CEREBRAL**

Para determinar el grado de daño cerebral, todos los animales fueron valorados funcionalmente los dos meses siguientes a la realización del traumatismo cerebral a través de dos test:

- Escala de valoración sensitivo-motora.
- Trayectoria: movimiento lineal.

El Rotarod fue retirado puesto que en el transcurso de la PARTE I se observó que no era capaz de distinguir entre diferentes niveles ya que aporta cierto grado de aprendizaje por parte de los animales.

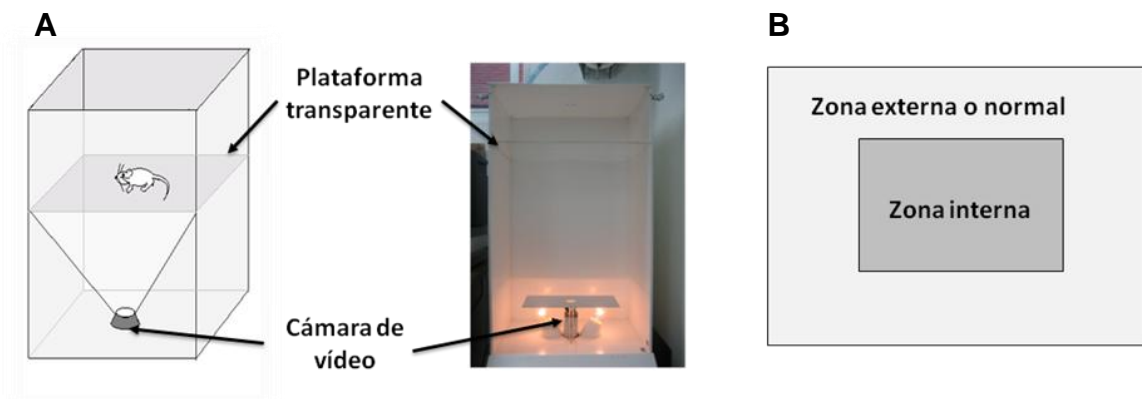
### **a) Escala de valoración sensitivo-motora**

La Escala de valoración sensitivo-motora utilizada para la detección de los niveles de lesión cerebral fue realizada tal y como se describe en el apartado **2.2. a)** de la PARTE I.

### **b) VTB test**

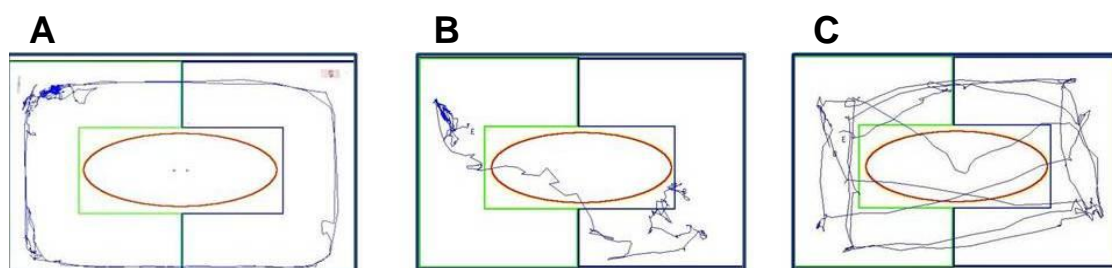
Para una valoración más objetiva de la función neurológica se utilizó un nuevo método de valoración que consta de un soporte informático (Smart) unido a una cubículo donde se captan imágenes de vídeo (VTB test). A través del VTB test podemos estudiar la función neurológica de los animales ya que se cuantifican parámetros del comportamiento como la actividad motora y la orientación. Este método ha sido usado en nuestro laboratorio para cuantificar la recuperación funcional en ratas Wistar adultas con una lesión cerebral adquirida como consecuencia de una hemorragia intracerebral (Otero et al, 2010), o una lesión traumática (Bonilla et al, 2009a).

El VTB test analiza las imágenes captadas a través de una videocámara colocada en la base de una caja cerrada de 35x45 cm de base sobre la que se colocan los animales susceptibles de ser evaluados (**Figura 14**).



**Figura 14:** VTB test, donde se muestra: **A**, estructura que compone el sistema de captación, y **B**, áreas definidas para analizar las imágenes captadas.

Para el estudio de comportamiento, se tomaron una serie de parámetros: las imágenes se captaron durante 90 segundos y la velocidad máxima de los animales se estableció en 10 cm/s. Se definieron una serie de áreas con el fin de establecer las diferencias en el movimiento y la orientación de los animales dentro del cubil, las cuales se agruparon en dos zonas principales: zona interior y zona exterior del campo. Los animales sanos se mueven preferentemente por la zona exterior, mientras que los animales lesionados lo hacen indistintamente por ambas zonas.



**Figura 15:** Imágenes obtenidas en el VTB test, donde se muestra **A**, el movimiento de un animal sin lesión cerebral y **B** y **C**, el movimiento de animales con diferentes niveles de lesión cerebral traumática crónica.

Se estudió el Tiempo de permanencia en la zona interior, que representa la cantidad de tiempo que un animal pasa dentro de la zona de estudio. Existe una relación entre la cantidad de tiempo que los animales pasan en dicha zona y la gravedad de la lesión cerebral existente: más tiempo significa más nivel de lesión cerebral (**Figura 15**).

### **3. RELACIÓN ENTRE LA EFECTIVIDAD DE LA TERAPIA CELULAR Y EL NIVEL DE LESIÓN CEREBRAL CRÓNICA**

Tras conocer los resultados del estudio anterior (dos meses después de realizar el modelo de lesión cerebral traumática), se intentó determinar si el nivel de déficit neurológico puede influir en la eficacia de la terapia celular.

#### **3.1. CULTIVO DE CMM**

La obtención del material donante para la obtención de CMM, así como su mantenimiento y preparación y caracterización para la realización de los trasplantes para desarrollar la PARTE II del presente trabajo, se realizó tal y como se describe en el apartado **3.1.** de la PARTE I.

Con el fin de aumentar la eficacia de la terapia para tratar las secuelas de la lesión cerebral traumática experimental grave se trasplantaron  $5 \times 10^6$  CMM en lugar de  $3 \times 10^6$  CMM. El botón celular obtenido fue diluido en suero fisiológico al volumen requerido para el trasplante, aproximadamente 30  $\mu$ L y cargadas en una jeringuilla Hamilton de 50  $\mu$ l, en condiciones estériles y bajo campana de flujo laminar.

#### **3.2. TERAPIA CELULAR CON CMM**

El tratamiento intralesional se realizó teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el punto **2**. Niveles de déficit neurológico de la PARTE II del presente estudio.

### a) Determinación de los grupos experimentales

Para poder definir los grupos experimentales, las ratas correspondientes a los grupos de lesión grave y lesión media se dividieron aleatoriamente en dos subconjuntos: aproximadamente el 50% de los animales de cada nivel de lesión fue derivado al grupo experimental que recibió el tratamiento con CMM, y aproximadamente el otro 50% de los animales de cada nivel de lesión se derivó al grupo experimental que recibió el tratamiento control con suero fisiológico. Las ratas correspondientes al grupo de lesión leve fueron retiradas del estudio debido a que su bajo nivel de lesión puede enmascarar los resultados obtenidos con el tratamiento con CMM y suero.

Los grupos experimentales finales para tratar de determinar la efectividad de la terapia celular con CMM en lesiones cerebrales traumáticas permanentes se establecieron como sigue (**Tabla 11**):

Déficit neurológico	Grupos experimentales
Lesión leve	Animales retirados del estudio
Lesión media o moderada	<b>CMM:</b> aproximadamente el 50% de los animales con lesión media <b>Suero salino:</b> aproximadamente el 50% de los animales con lesión media
Lesión grave	<b>CMM:</b> aproximadamente el 50% de los animales con lesión grave <b>Suero salino:</b> aproximadamente el 50% de los animales con lesión grave

**Tabla 11:** Definición de los grupos experimentales para determinar la efectividad de la terapia celular con CMM según el nivel de déficit neurológico en animales con un daño cerebral traumático permanente.



## b) Trasplante intracerebral

Trascurridos 2 meses del desarrollo del TCE todas las ratas fueron nuevamente anestesiadas y medicadas como se expone en el apartado **3.2.** de la PARTE I.



**Figura 16:** Trasplante intralesional de 5 millones de células madre obtenidas de médula ósea de ratas macho donantes en ratas con una lesión cerebral traumática con dos meses de evolución.

Una vez realizada la apertura del campo quirúrgico, se procedió a realizar el trasplante intralesional con CMM o suero fisiológico (**Figura 16**) según el grupo experimental correspondiente.

- Grupo lesión leve: animales que deben abandonar el estudio.
- Grupo lesión media:
  - Trasplante intralesional de  $5 \times 10^6$  CMM en 30  $\mu$ L de suero fisiológico a través de una jeringuilla Hamilton de 50  $\mu$ L.
  - Trasplante intralesional de 30  $\mu$ L de suero fisiológico a través de una jeringuilla Hamilton de 50  $\mu$ L.
- Grupo lesión grave:
  - Trasplante intralesional de  $5 \times 10^6$  CMM en 30  $\mu$ L de suero fisiológico a través de una jeringuilla Hamilton de 50  $\mu$ L.
  - Trasplante intralesional de 30  $\mu$ L de suero fisiológico a través de una jeringuilla Hamilton de 50  $\mu$ L.

### 3.3. SEGUIMIENTO DE LA FUNCIÓN NEUROLÓGICA DESPUÉS DE LOS TRATAMIENTOS.

Para llevar a cabo el seguimiento de la función motora y sensorial se realizaron los test descritos anteriormente en el apartado **2.2.** de la PARTE II (Escala de valoración sensitivo-motora y Trayectoria, test VTB).

Se tomaron semanalmente, durante los dos meses siguientes a la administración de los tratamientos, los datos de la evolución de los animales tratados con CMM y de los animales controles de los dos niveles de lesión (animales con lesión media y animales con lesión grave) y se analizaron los posibles cambios entre los grupos.

## 4. ESTUDIO HISTOLÓGICO

El estudio histológico se desarrolló tal y como se describe en el apartado **4.** de la PARTE I, pero con algunas modificaciones.

### 4.1. VOLUMEN DE LA CAVIDAD POSTRAUMÁTICA

En cada caso, el volumen de lesión fue calculado en los cortes histológicos de acuerdo a la siguiente fórmula (Houchens, 1978; Morales et al, 2002).

$$V(\text{mm}^3) = \frac{d^2(\text{mm}^2) \times D(\text{mm})}{2}$$

- V: volumen de lesión.
- d: diámetro menor.
- D: diámetro mayor.

## 4.2. CARACTERIZACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

En el presente estudio, la caracterización inmunohistoquímica de la zona de lesión se realizó mediante la utilización de diferentes marcadores celulares.

### a) Procedimiento general.

El procedimiento general inmunohistoquímico se realizó como se describe en el apartado **4.1. a)** de la PARTE I.

### b) Marcadores específicos.

Para poder comprobar cómo el trasplante de las CMM en el tejido cerebral dentro de los diferentes grupos experimentales puede relacionarse con la expresión de diferentes marcadores, y como dicha expresión está condicionada por el tratamiento administrado y el nivel de lesión cerebral crónico se estudió la expresión específica de las siguientes proteínas (ver apartado **4.1.** de la PARTE I y **Tablas 8 y 9**):

- Estudio de marcadores neuronales y gliales:
  - NF-200: marcador de filamentos intermedios típico del citoplasma de neuronas maduras.
  - PGFA.
- Estudio de la neurogénesis
  - Nestina.
  - Dcx: microtúbulo expresado por células progenitoras neuronales y neuronas inmaduras.
- Estudio de la proliferación
  - Ki-67.

#### **4.3. HIBRIDACIÓN IN SITU: Detección del gen Sry del cromosoma Y**

##### **a) Expresión de marcadores neuronales y gliales de las CMM trasplantadas**

Para localizar las células trasplantadas en los niveles de lesión media y lesión grave se procedió a realizar una Hibridación In Situ tal y como se describe en el apartado **4.2.** de la PARTE I.

##### **b) Microscopía confocal.**

La detección de las células macho donantes trasplantadas y de su posible diferenciación hacia elementos neurales y gliales dentro del estudio de influencia de la gravedad de la lesión traumática cerebral en la efectividad de la terapia celular se realizó en la Unidad de Microscopía Confocal de la Fundación para la investigación Biomédica del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda.

Para ello se añadió una única modificación a la técnica anteriormente descrita: la detección de los núcleos celulares se realizó mediante To-pro 3 (Invitrogen) en vez del marcador nuclear DAPI.

La Unidad de Microscopía Confocal consta de un Microscopio Confocal Leica TCS SP5 invertido con aumentos 10x, 20x, 40x, 63x con contraste de interferencia (Normasky) y que presenta 3 líneas de laser, mas una línea de luz transmitida con AOBS. Las líneas de laser específicas de las que consta son:

- Argón/ (458, 477, 488, 496, 514nm)
- 543 nm HeNe laser
- 633 nm HeNe laser

## **5. ESTUDIO ESTADÍSTICO**

El estudio estadístico realizado fue común para la PARTE I y PARTE II desarrolladas en el presente estudio. Los datos recogidos fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS versión 15.0.

### **5.1. RECOGIDA DE DATOS**

Todos los datos fueron recogidos por dos personas ajenas a los parámetros de estudio, es decir, con desconocimiento del tiempo de evolución de los animales, nivel de déficit neurológico establecido en la fase crónica de la lesión cerebral y desconocimiento de si los animales habían recibido o no algún tipo de tratamiento (suero fisiológico o CMM).

### **5.2. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LA FUNCIÓN NEUROLÓGICA TRAS EL TRASPLANTE INTRALESIONAL DE CMM**

En el caso del test sensitivo-motor se representan los valores tomados a partir de la escala de la figura 5, expresando los valores en cada grupo como la media $\pm$ desviación típica. En el caso del Rotarod se otorga el 100% a la puntuación que realiza el animal en el primer punto (Normal), ya que es el máximo tiempo que el animal es capaz de mantener el equilibrio sobre el rodillo, y así se detectaron los posibles cambios también como porcentajes. La expresión de los datos se muestra como la media $\pm$ desviación típica. Las posibles diferencias estadísticas en la recuperación neurológica, así como el comportamiento de los datos a lo largo del tiempo se estudiaron a través del test de Análisis de varianzas (ANOVA) usando el programa informático SPSS.

### **5.3. ESTABLECIMIENTO DE LOS NIVELES DE LESIÓN CEREBRAL**

Una vez establecida la lesión (fase crónica), se detectaron diferencias evidentes en el estado neurológico de los animales, es decir en su déficit

funcional. Para ello se intentó agrupar a los animales según su grado de lesión en:

- Lesión leve: animales que deben abandonar el estudio por mostrar pocos déficits neurológicos.
- Lesión media: daño cerebral más habitual al realizar una lesión focal por caída de un peso como se ha descrito anteriormente. La mayoría de los animales permanecieron en este grupo.
- Lesión grave: animales con grandes déficits neurológicos, tanto sensoriales como motores.

Para poder realizar la separación según el grado de lesión cerebral se analizaron los datos de todos los animales correspondientes a la Escala de valoración sensitivo-motora y Tiempo de permanencia en la zona interior del cubículo anteriores a la realización de los tratamientos. Todos los datos se analizaron utilizando el programa estadístico SPSS a través del estudio de los diagramas de frecuencia.

Se sacaron del estudio los animales que mostraban poca frecuencia en los parámetros analizados, considerándose que mostraron una lesión leve. A los animales que aparecieron en el rango intermedio al analizar las tres categorías de estudio se les agrupó en lesión moderada, y por último aquellos animales, que aún mostrando una frecuencia baja, mostraban claros síntomas de deficiencias neurológicas y que se salían del conjunto de datos fueron agrupados en lesión severa.

#### **5.4. EFICACIA DE LA TERAPIA CELULAR SEGÚN EL NIVEL DE DÉFICIT NEUROLÓGICO PERMANENTE**

Sensibilidad de los test para detectar los cambios neurológicos que se producen como consecuencia de la administración de las CMM: se toman datos semanalmente de la evolución de los animales tratados con CMM y de

los animales controles dentro de los niveles de lesión media y grave y se analiza estadísticamente la capacidad de detectar los cambios entre:

- Tratamientos dentro del mismo grupo
- Mismo tratamiento en los dos grupos.

Tanto en la Escala de valoración neurológica como en el Tiempo de permanencia en la zona interior del cubículo se representaron los valores obtenidos, expresando los mismos como la media del porcentaje de recuperación $\pm$ desviación típica. Se otorga el 100% a la puntuación que realizó el animal en el primer punto (Normal), y 0% al valor obtenido como medida de su estado de déficit cerebral crónico, así se detectaron los cambios como porcentaje de recuperación. Las posibles diferencias estadísticas de los datos se estudiaron a través del test de Análisis de varianzas (ANOVA), usando el programa informático SPSS, en las semanas 2, 4, 6 y 8 post-trasplante con el fin de poder detectar los efectos que se producen como consecuencia de los tratamientos y los niveles de lesión.

## **5.5. ESTUDIO HISTOLÓGICO**

### **a) Estudio del volumen de lesión**

Los datos obtenidos del volumen de lesión de los animales tratados con CMM y con suero de los dos niveles de lesión del estudio fueron analizados a través del estudio del test de Análisis de varianzas (ANOVA)

### **b) Estudio de marcadores neurales y detección de la neurogénesis**

Todas las muestras obtenidas fueron estudiadas cualitativamente bajo microscopio óptico convencional.

### **c) Estudio de proliferación celular**

Por cada grupo experimental se contó el número total de células inmunopositivas, los valores finales son expresados como la media $\pm$ desviación típica. Se realizó el test de la t de Student para poder comparar el número de células inmunopositivas de los animales tratados con CMM y con suero dentro de los niveles de lesión media y grave.



# RESULTADOS

---

---

## RESULTADOS

---

### **PARTE I:**

### **EFICACIA DE LA TERAPIA CELULAR EN LAS LESIONES TRAUMÁTICAS CEREBRALES CRÓNICAS**

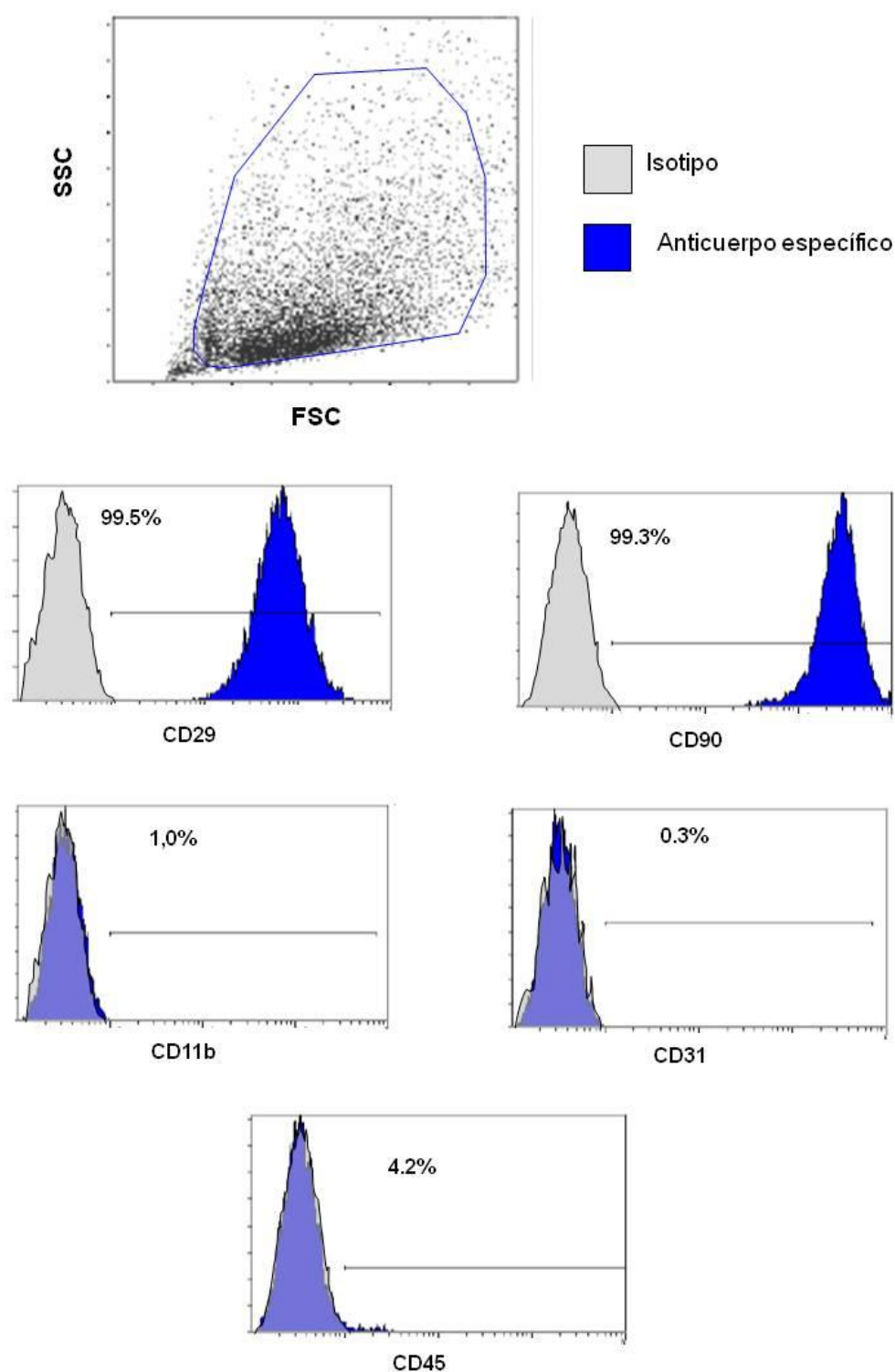
#### **1. ASPECTOS GENERALES**

Para la realización de la PARTE I del presente trabajo se utilizaron 29 ratas hembras Wistar adultas para la realización de la lesión traumática cerebral y 2 machos Wistar adultos para obtener el tejido donante de médula ósea para la obtención de CMM. A todas las ratas hembras se les realizó el trauma cerebral experimental previamente descrito, de ellas 9 murieron durante la cirugía o dentro de las primeras 48 horas de evolución del trauma (mortalidad de 31.03%). Tras el trauma se detectó un déficit evidente en todos los animales. Se obtuvieron resultados de los 2 métodos de valoración que se realizaron durante el transcurso de 4 meses desde la lesión cerebral y dos meses tras la realización de la terapia celular.

#### **2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CMM**

Todos los cultivos de CMM obtenidas del estroma de médula ósea de las ratas macho Wistar donantes cumplieron los criterios de selección definidos en la **Tabla 7** del Material y Métodos.

En la **Figura 17** se muestra un ejemplo de los fenotipos obtenidos a través del estudio de citometría de flujo de una muestra de CMM utilizada para la realización de los trasplantes.



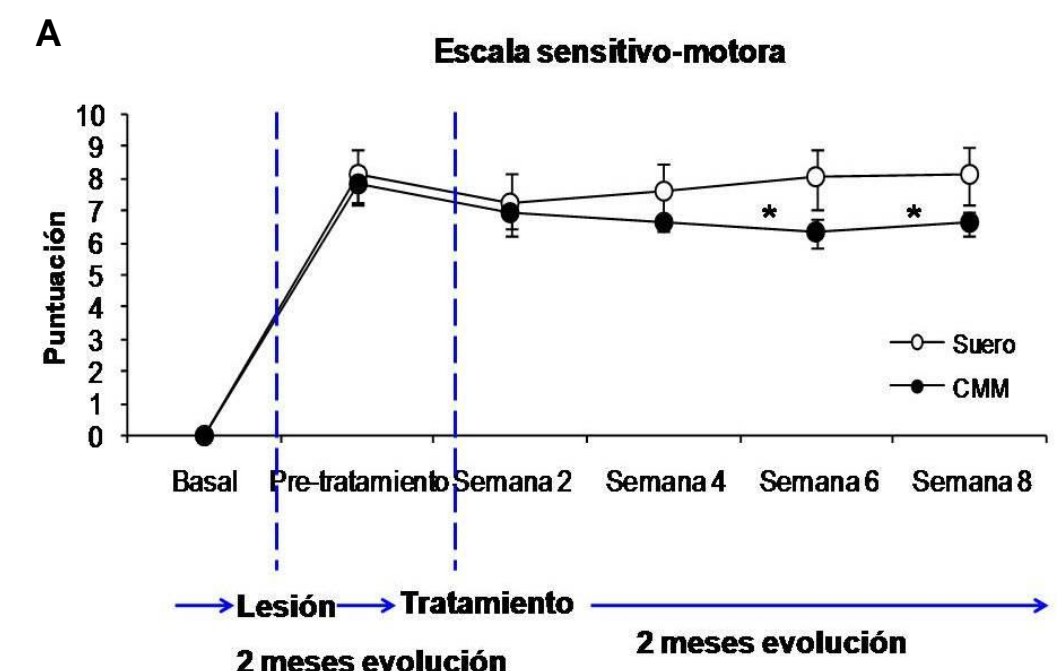
**Figura 17:** Ejemplo representativo de los datos obtenidos en el estudio de citometría de una muestra de un cultivo de CMM utilizado para realizar los trasplantes intracerebrales, en donde se muestra que cumplieron los criterios de selección establecidos en la **Tabla 7**.

### 3. EVOLUCIÓN DE LA FUNCIÓN NEUROLÓGICA

Tras la administración de los tratamientos se observó una mejora significativa en los animales trasplantados con CMM respecto de los animales controles.

#### 3.1. ESCALA DE VALORACIÓN SENSITIVO-MOTORA

En la Escala de valoración sensitivo-motora (**Figura 18**), se observó una mejora continua y progresiva de los animales trasplantados con CMM respecto de los controles, dicha recuperación comenzó a partir de la semana 6, manteniéndose en la semana 8 tras el trasplante ( $p < 0.05$ ).



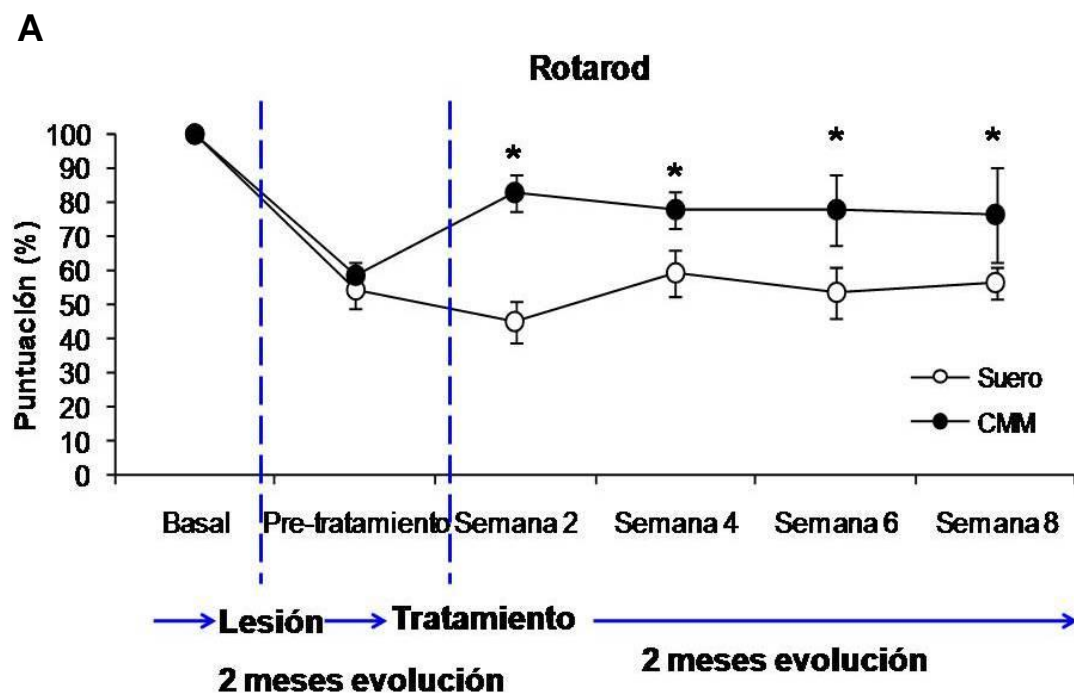
**B**

<i>Escala sensitivo-motora</i>						
	Basal	Pre-tratamiento	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8
<b>Suero</b>	0	8,1±0,80	7,2±0,98	7,6±0,88	8,0±0,94	8,1±0,92
<b>CMM</b>	0	7,8±0,57	6,9±0,45	6,6±0,22	6,3±0,44	6,6±0,40

**Figura 18:** **A:** Gráfica que muestra el perfil temporal de la recuperación funcional a través de la Escala sensitivo-motora del grupo tratado (CMM) respecto del grupo control (Suero). **B:** Tabla de datos de la Escala sensitivo-motora. Se observan diferencias significativas desde la semana 6 tras el tratamiento ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. ROTAROD

El Rotarod mide la coordinación y el equilibrio de los animales, los cuales se ven muy disminuidos tras el daño cerebral. Al realizar el trasplante de CMM se detectó una mejora progresiva en la función motora respecto del grupo control como se muestra en la **Figura 19**, la cual fue significativa en todos los puntos del modelo, comenzando en la semana 2 tras el tratamiento ( $p < 0.05$ ).



**B**

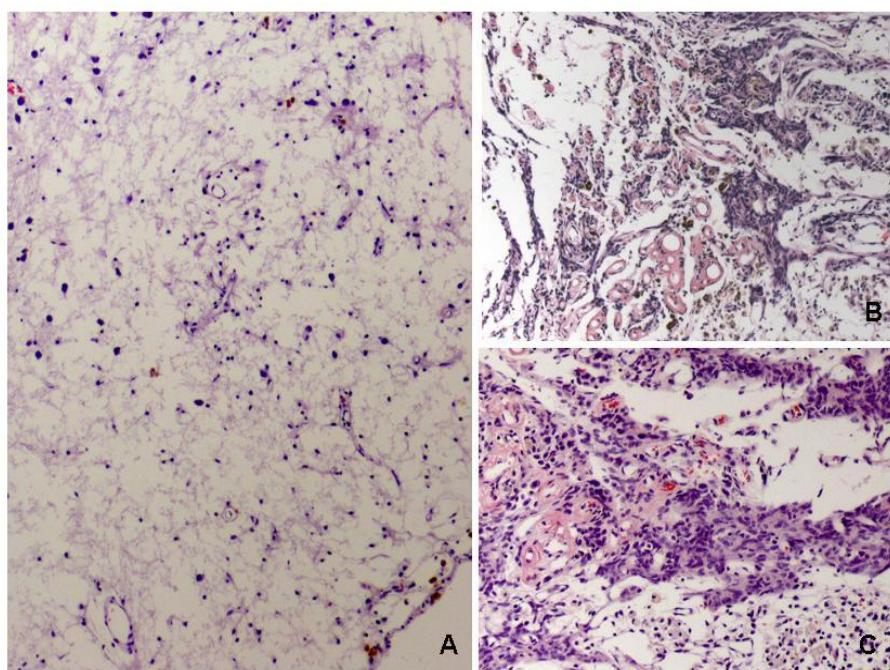
<i>Rotarod</i>						
	Basal	Pre-tratamiento	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8
<b>Suero</b>	100	54,4±5,2	44,8±6,0	59,1±6,7	53,5±7,7	56,5±4,8
<b>CMM</b>	100	58,9±3,7	82,7±5,5	77,9±5,7	78±10,2	76,5±13,7

**Figura 19:** **A:** Gráfica que muestra el perfil temporal de la recuperación funcional a través de las medidas tomadas con el Rotarod del grupo tratado (CMM) respecto del grupo control (Suero). **B:** Tabla de datos de las medidas del Rotarod. Se observan diferencias significativas en todos los puntos desde el tratamiento ( $p < 0.05$ ).

## 4. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS

### 4.1. DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA

Al finalizar el estudio se realizaron estudios morfológicos utilizando los cortes histológicos teñidos con H-E de la zona de lesión, donde no se detectaron cambios evidentes en el volumen de la misma cuando se compara el grupo trasplantado con CMM y el grupo tratado con suero fisiológico.

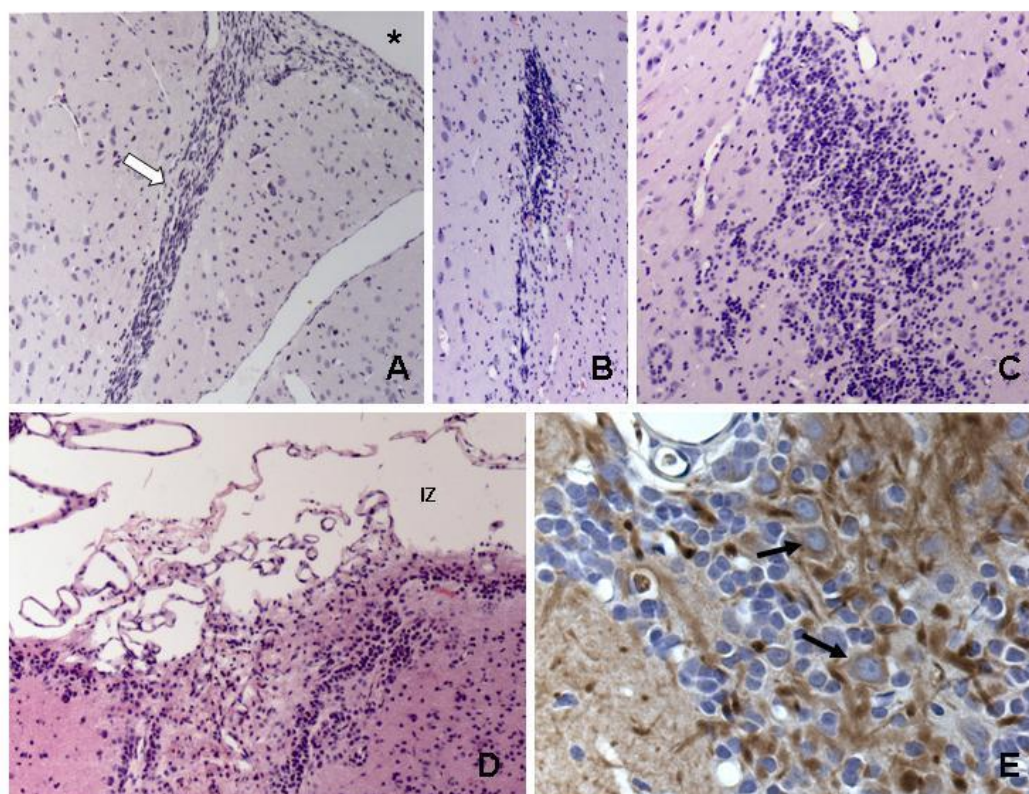


**Figura 20:** **A:** Corte histológico de la zona de lesión de un animal del grupo control donde se observa restos de tejido necrótico residual (H.E. Aumento 100x). **B y C:** Zona de lesión de cerebros de ratas que recibieron CMM, donde se observa una gran vascularización, así como puentes titulares que invaden parcialmente la cavidad necrótica post-traumática (H.E. Aumento 100x en A y 200x en B).

En la zona de la lesión, los animales del grupo control mostraban las típicas secuelas asociadas con el daño cerebral grave, como son la presencia de una gran cavidad necrótica parcialmente invadida por macrófagos, células inflamatorias y algunos astrocitos reactivos. Las ratas pertenecientes al grupo tratado con CMM presentaban puentes titulares dentro de la zona de lesión así como gran cantidad de vasos sanguíneos (**Figura 20**).



Dentro de la zona subventricular (ZSV) se observó un aumento en la celularidad en los animales trasplantados con CMM respecto de los controles, observándose aglomerados celulares en dicha ZSV que parecen formar vías a través del parénquima cerebral que invaden la zona de lesión (**Figura 21**). Tanto en la ZSV como en el área de la lesión se observó un número variable de células positivas a MAP-2 y PGFA.

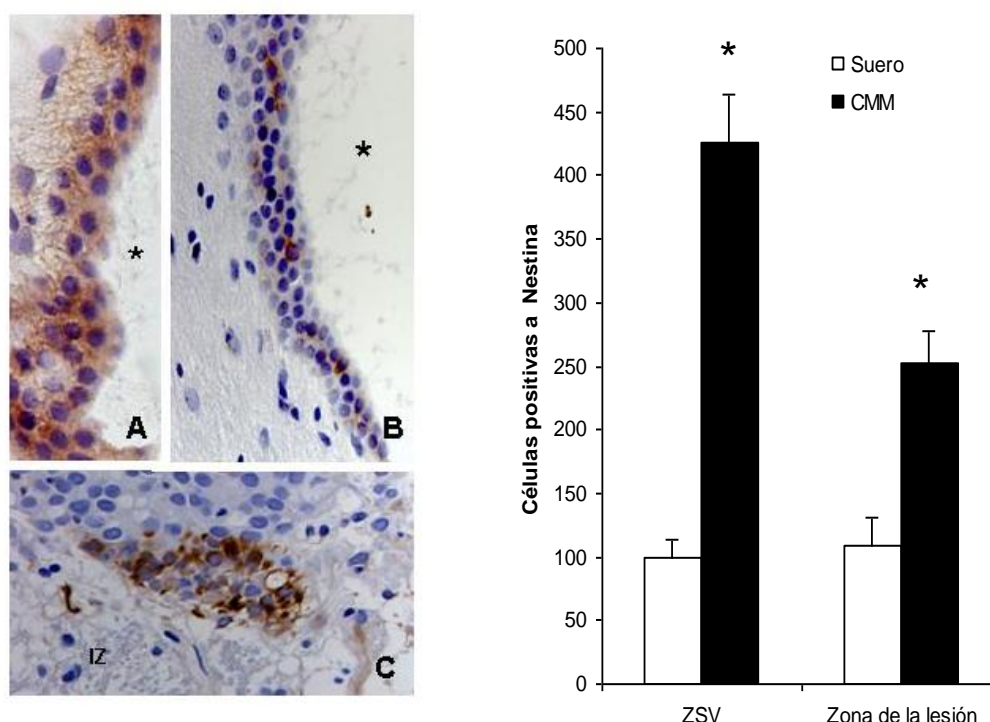


**Figura 21:** Cortes histológicos de ratas que recibieron CMM. **A:** Penetración en el parénquima, cerca de la lesión, de células desde la ZSV ( \*: ventrículo. H.E., Aumento 100x). **B y C:** Aglomerados celulares intraparenquimatosos cercanos a la zona de lesión (H.E., Aumento de 100x en B y 200x en C). **D:** Zona donde se muestran células positivas a MAP-2 y células con aspecto de neuroblastos (Aumento 400x).

## 4.2. NEUROGÉNESIS Y PROLIFERACIÓN

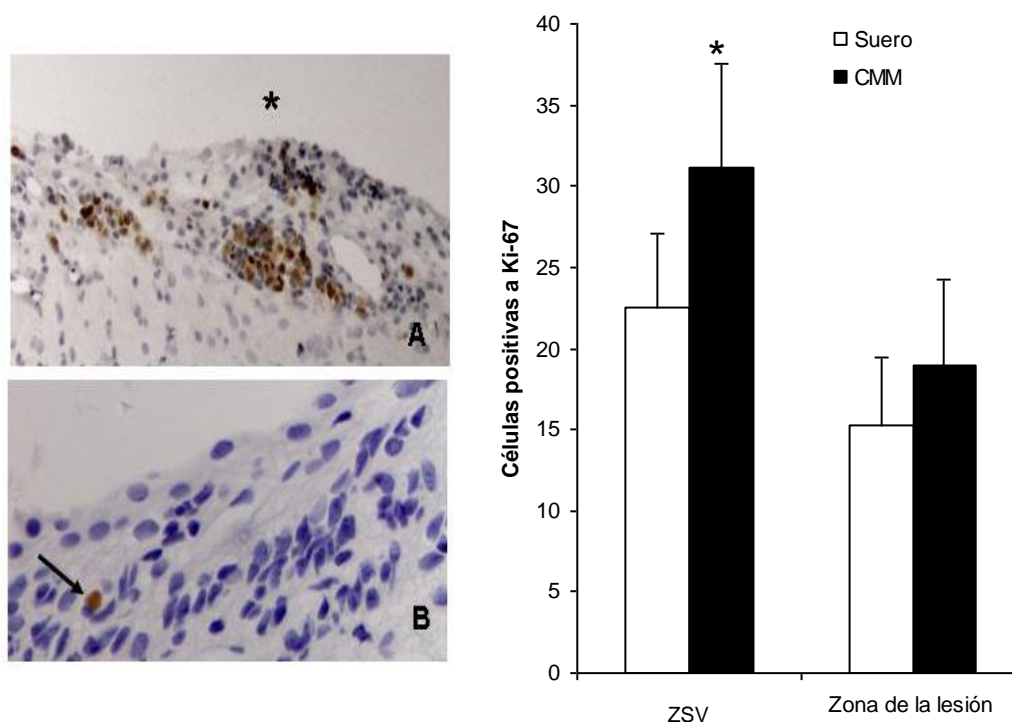
El recuento del número de células positivas a Nestina (**Figura 22**) mostró que existen diferencias significativas tanto en la ZSV ( $426 \pm 37,1$  células del grupo CMM respecto  $99,7 \pm 14,3$  células del grupo control) como en la zona de lesión

( $253 \pm 25,2$  células en el grupo trasplantado con CMM y  $108,7 \pm 21,7$  del grupo control) entre el grupo trasplantado con CMM y el grupo control ( $p < 0.05$ ).



En cuanto al recuento de aquellas células que se encuentran en proliferación (**Figura 23**), se observaron diferencias significativas entre ambos grupos en la ZSV ( $31,1 \pm 6,5$  respecto  $22,5 \pm 4,6$  células totales del grupo CMM y control respectivamente). En la zona de lesión, aunque el número de células positivas a Ki-67 es mayor, no es significativo estadísticamente ( $18,9 \pm 5,4$  células en el grupo trasplantado con CMM comparado con  $15,3 \pm 4,2$  del grupo control) ( $p > 0.05$ ).





**Figura 23:** Gráfica de barras y estudios inmunohistoquímicos, donde se observa la diferencia en el número de células positivas a Ki-67 en la ZSV y en la zona de lesión entre ratas del grupo control (Suero) y ratas trasplantadas con CMM. El grupo con CMM presenta más cantidad de células positivas que el grupo control, mostrando diferencias significativas a nivel de la ZSV pero no de la zona de lesión ( $p < 0.5$ ). **A:** Expresión de Ki-67 en la ZSV de ratas del grupo tratado con CMM (\*: ventrículo. Aumento 200x). **B:** Célula aislada presentando positividad a Ki-67, corte histológico de una rata del grupo control (Aumento 400x).

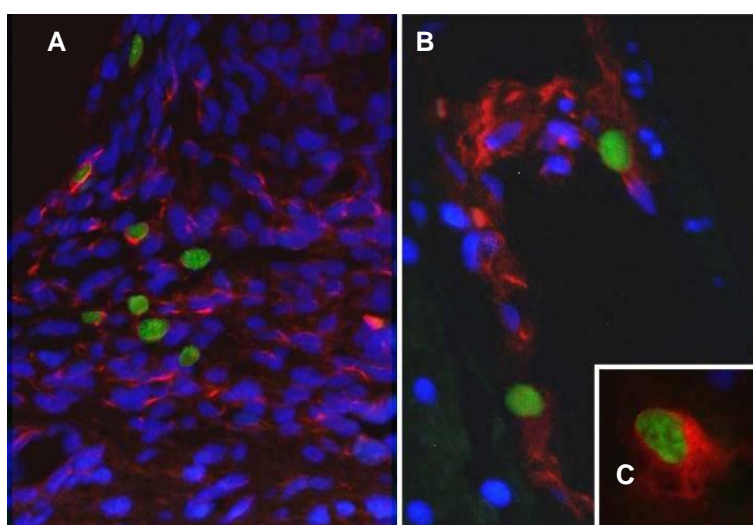
Dentro de la zona de lesión, y concretamente dentro de los puentes tisulares del grupo tratado con células madre se localizaron, a través de la microscopía de fluorescencia, células con un fuerte marcaje a Nestina, donde algunas de fueron también positivas para Ki-67 (**Figura 24**).

#### 4.3. DETECCIÓN DE LAS CMM TRASPLANTADAS

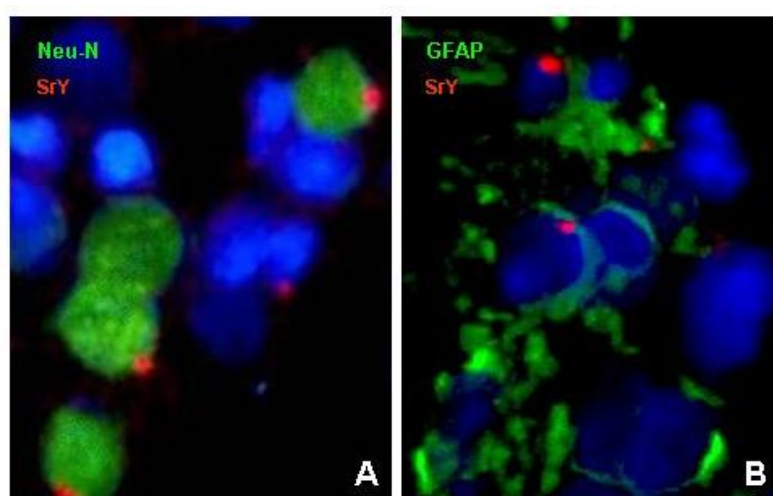
Los estudios de Hibridación In Situ para la detección del gen Sry de las CMM trasplantadas, mostró un número variable de dichas células distribuidas por todos los bordes de la cavidad post-traumática, localizándose principalmente en la zona de la lesión. No se detectaron células positivas al gen Sry en los animales del grupo control.

### a) Expresión de marcadores neurales en las CMM trasplantadas

Los estudios de Hibridación In Situ junto con la expresión de marcadores neuronales y gliales mostró la existencia de CMM positivas para Neu-N o PGFA dentro de la zona de lesión (**Figura 25**).



**Figura 24:** Estudios de microscopía de fluorescencia en ratas trasplantadas con CMM. Co-expresión de Nestina (Rojo) y Ki-67 (Verde) en células dentro de **A** la ZSV, **B** y **C** la zona de lesión (Aumento 400x)



**Figura 25:** Estudios de microscopía de fluorescencia en ratas trasplantadas con CMM. Co-marcaje del gen Sry (Rojo) del cromosoma Y de las CMM trasplantadas con **A** Neu-N (verde) y **B** PGFA (verde) (Aumento 400x).

## **PARTE II:**

### **EFICACIA DE LA TERAPIA CELULAR EN FUNCIÓN DEL NIVEL DE LESION TRAUMÁTICA CEREBRAL CRÓNICA**

#### **1. ASPECTOS GENERALES**

Para la realización de la segunda parte del presente trabajo se utilizaron 62 ratas hembras Wistar adultas para la realización de la lesión traumática cerebral y 5 machos Wistar adultos para obtener el tejido donante de médula ósea para la obtención de CMM.

A todas las ratas hembras se les realizó el trauma cerebral experimental previamente descrito, de ellas 9 murieron durante la cirugía o los primeros minutos tras la lesión cerebral (mortalidad de 14.52%). Las 53 ratas restantes mostraron síntomas evidentes de lesión neurológica al despertar tras el procedimiento.

De ellas tres fueron sacrificadas antes de finalizar la primera semana tras el TCE experimental (mortalidad de 4.84%), debido a que no fueron capaces de evolucionar hasta un estado que permitiera su supervivencia de forma independiente. De las 50 ratas que sobrevivieron, a 4 se les administraron los cuidados post-operatorios establecidos en la **Tabla 10** durante dos semanas en lugar de una, ya que aunque eran animales totalmente dependientes de los cuidados administrados mostraban signos de poder llegar a recuperarse manteniendo síntomas claros de lesión cerebral grave, que era uno de los niveles de lesión cerebral necesario para el desarrollo del presente trabajo.

Con el modelo de lesión cerebral traumática empleado la mortalidad final fue de un 19.36% (**Tabla 12**), resultando un 11,67% menor que la mortalidad obtenida en la PARTE I del presente trabajo, donde no se siguió el protocolo de cuidados de animales con lesiones cerebrales traumáticas.

	Número	Mortalidad
<b>PARTE I: Sin cuidados post-operatorios</b>		
Animales que sobreviven	20	
Animales que no sobrevivieron a las primeras 48h post-TCE	9	
	29	31.03%
<b>PARTE II: Con cuidados post-operatorios</b>		
Animales que sobreviven	50	
Animales que no sobrevivieron a las primeras 24h post-TCE	9	14.52%
Animales eutanasiados en la primera semana post-TCE	3	4.84%
	62	19.36%

**Tabla 12:** Número de animales utilizados en el presente trabajo y mortalidad asociada a la realización del mismo.

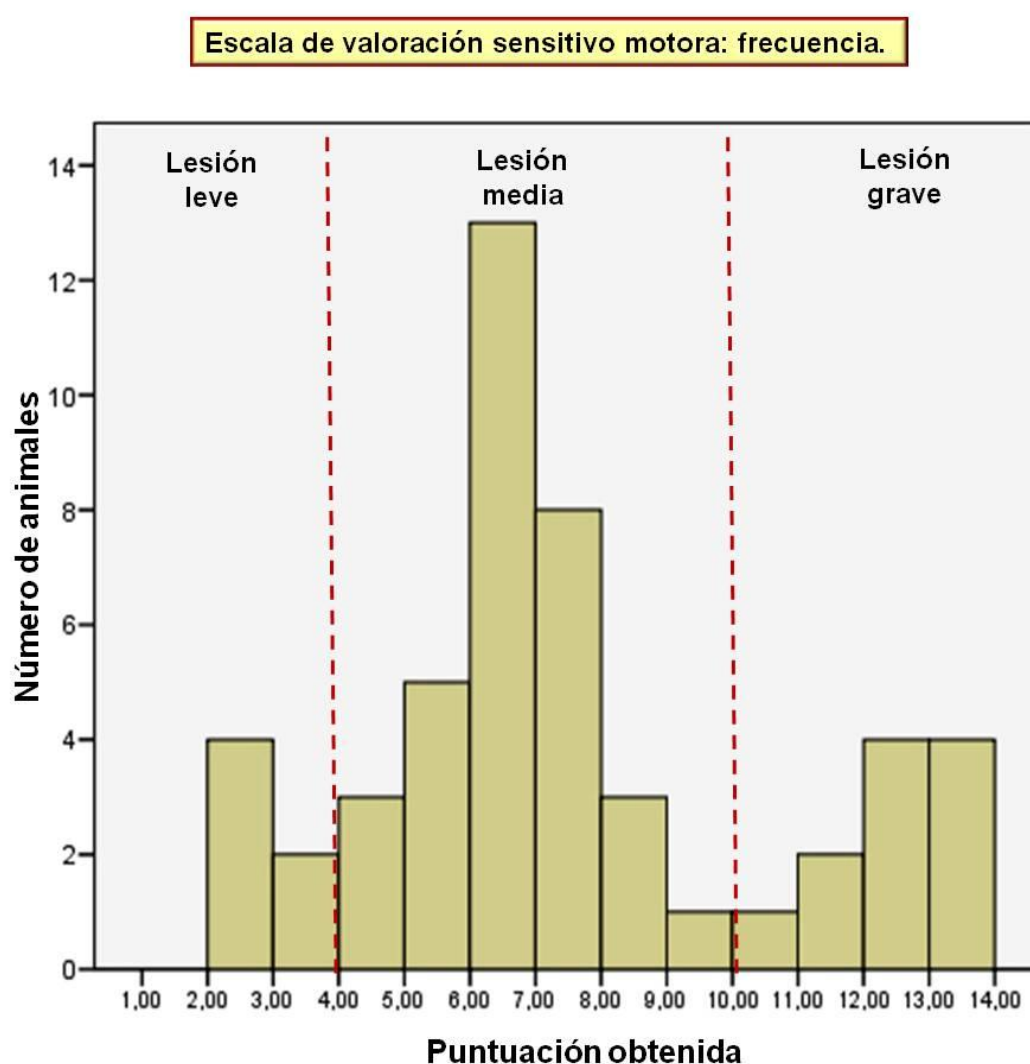
## 2. ESTABLECIMIENTO DE NIVELES DE LESIÓN CEREBRAL CRÓNICA EN ROEDORES

Con el estudio de los test de frecuencia de los datos obtenidos a través de los dos métodos de valoración (Escala de valoración sensitivo-motora, y Tiempo de permanencia en la zona interior, test VTB), se establecen tres niveles de gravedad de la lesión: leve, medio o moderado y grave. Para ello se utilizan como referencia las Escalas de recuperación y de coma de Glasgow (Teasdale y Jennett, 1974; Jennett y Bond, 1975) (**Tabla 3 y 4**), con el fin de intentar trasladar los resultados obtenidos a lo que se observa en la clínica humana.

### 2.1. ESCALA DE VALORACIÓN SENSITIVO-MOTORA

En el diagrama de frecuencia obtenido en la Escala de valoración sensitivo-motora (**Figura 26**) se observan tres picos que nos agrupan los datos en tres conjuntos diferentes:

- Primer conjunto, corresponde a los animales que obtuvieron menos de 4 puntos en la Escala de valoración neurológica y agrupa un total de 6 ratas.
- Segundo conjunto, abarca a aquellos animales que obtuvieron más de 4 puntos y menor o igual a 10 puntos en la escala, es donde se concentra el mayor grueso de datos obtenidos con un total de 33 ratas.
- Tercer conjunto, corresponde a aquellos animales que obtuvieron más de 10 puntos en la escala y abarca un total de 11 ratas.



**Figura 26:** Diagrama de frecuencia de la Escala de valoración sensitivo-motora: dentro de la escala aparecen tres conjuntos de datos que nos dividen las ratas en tres niveles de lesión (leve, media y grave).

Aquel conjunto de datos correspondiente a los animales que obtuvieron menor puntuación fue asignado al grupo de animales con lesión leve. Los animales agrupados en el segundo conjunto de datos se asignaron al grupo de animales con lesión media. Por último, el tercer conjunto de datos fue asignado al grupo de lesión grave, por tratarse de aquellos animales que obtuvieron una mayor puntuación en la Escala de valoración sensitivo-motora.

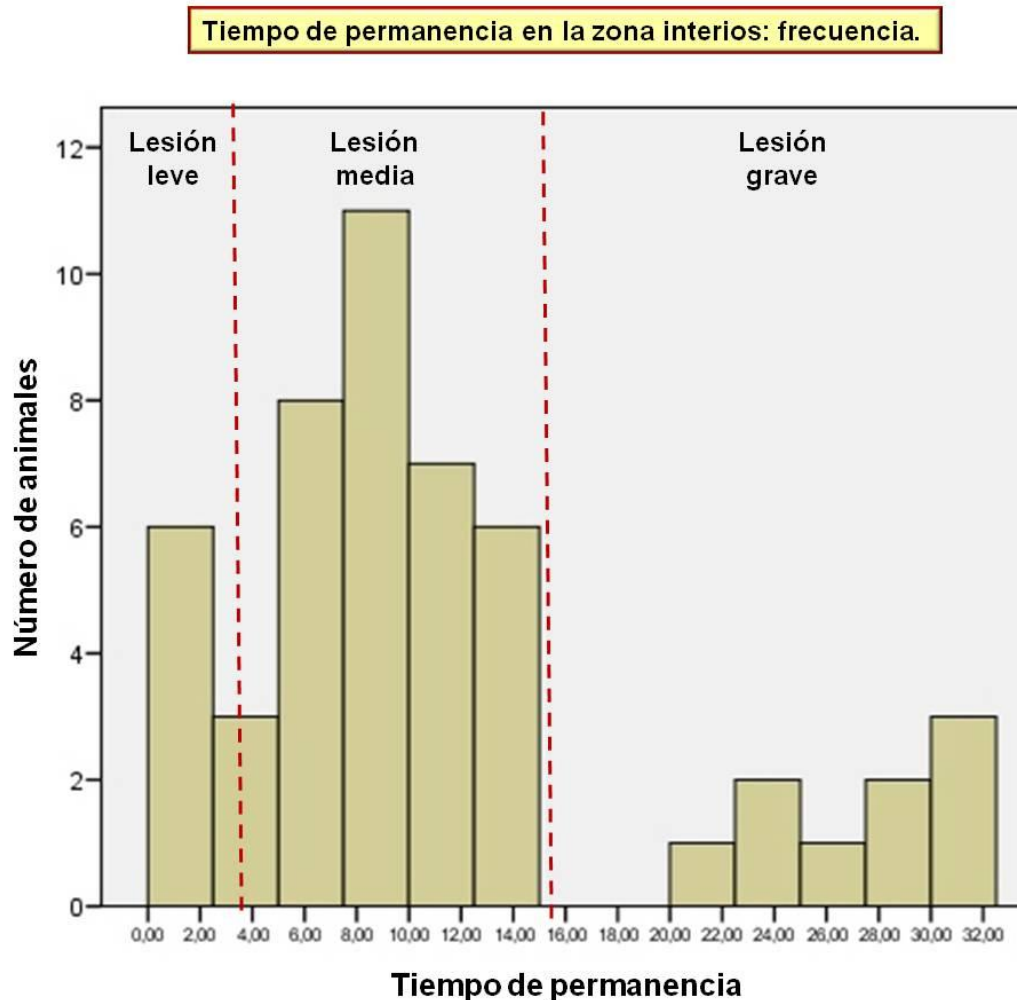
## **2.2. TIEMPO DE PERMANENCIA EN LA ZONA INTERIOR (VTB test)**

El estudio del diagrama de frecuencia de los datos correspondientes al Tiempo de permanencia en la zona interior del cubículo de estudio (test VTB) obtenidos a través del Smart, revela una tendencia de los datos a agruparse también en tres conjuntos, aunque los tres niveles resultantes fueron menos evidentes que en el caso de los obtenidos en el diagrama de frecuencia de la Escala de valoración sensitivo-motora (**Figura 27**):

- Primer conjunto, corresponde a los animales que pasaron menos de 4 segundos en la zona interior del cubículo de estudio y concentra un total de 6 ratas.
- Segundo conjunto, corresponde a aquellos animales que permanecieron más de 4 segundos y menor o igual a 15 dentro de la zona de estudio y abarca el mayor grueso de animales con un total de 35 ratas.
- Tercer conjunto, corresponde a aquellos animales que pasaron más de 15 segundos en la zona interior del área de estudio, siendo 9 ratas en total.

Como en el caso de los resultados de la Escala de valoración sensitivo-motora se asignó a cada conjunto un nivel de lesión. El primero, el correspondiente a los animales que pasaron menos tiempo en la zona interior, se asignó al grupo de animales con lesión leve. Los animales del segundo conjunto de datos se agruparon dentro del grupo de lesión media. Por último el tercer conjunto de datos, el cual abarca a los animales que pasaron más tiempo en la zona de

estudio, se asignó al grupo de lesión grave por tratarse de aquellos animales que pasaron una mayor cantidad de tiempo dentro de la zona de estudio, lo cual se asocia a lesión cerebral grave.



**Figura 27:** Diagrama de frecuencia de los datos correspondientes al Tiempo de permanencia en la zona interior del cubículo de estudio (test VTB) obtenidos a través del Smart: aparecen tres conjuntos de datos que nos dividen las ratas en tres niveles de lesión (leve, media y grave).

### 2.3. NIVELES DE LESION CEREBRAL CRÓNICA EN ROEDORES

Debido a que hay animales que obtuvieron un nivel de lesión diferente según el test de valoración utilizado (Escala de valoración sensitivo-motora y Tiempo de

permanencia en la zona interior del cubículo de estudio), se establecieron una serie de criterios para determinar el nivel de deterioro neurológico final (lesión leve, lesión media o lesión grave) asociado a una lesión traumática cerebral experimental en ratas. Los criterios establecidos para definir el nivel de lesión se resumen en la **Tabla 13** y fueron:

Déficit neurológico	Escala sensitivo-motora (puntos)	Tº. Permanencia zona interior (segundos)	Criterios de inclusión
<b>Lesión leve</b>	< 4	< 4	<b>Lesión leve</b> en ambos test
<b>Lesión media</b>	4-10	4-15	<b>Lesión media</b> al menos en uno de los tests, siendo el otro lesión leve
<b>Lesión grave</b>	> 10	> 15	<b>Lesión grave</b> al menos en uno de los dos tests

**Tabla 13:** Número de animales utilizado en el presente trabajo y mortalidad asociada a la realización del mismo.

#### a) Lesión leve

Los animales con lesión leve en ambos estudios mostraron poco déficit neurológico en general. Se determinó que dichos animales (6 en total) se retiraran del estudio, puesto que su seguimiento a largo plazo podría artefactar en gran medida el estudio comparativo de la eficacia de la terapia celular. Los animales excluidos del estudio por mostrar un nivel de lesión leve deben cumplir:

- Escala de valoración sensitivo-motora: puntuación menor de 4.
- Tiempo de permanencia en la zona interior: permanecer menos de 4 segundos en la zona interior del cubículo de estudio.



**b) Lesión media**

Para establecer el criterio de los animales con lesión media se determinó que en al menos uno de los test debían estar en dicha categoría (29 animales). Por lo tanto los animales con lesión cerebral media deben cumplir al menos uno de los criterios de lesión media, siendo el otro de lesión leve:

- Escala de valoración sensitivo-motora: puntuación igual o mayor de 4 y menor o igual a 10.
- Tiempo de permanencia en la zona interior: permanecen un tiempo igual o mayor de 4 segundos y menor o igual a 15 segundos en la zona interior del cubículo de estudio.

**c) Lesión grave**

Los animales que obtuvieron una clasificación de lesión grave en cualquiera de los test fueron asignados inmediatamente a la categoría de lesión grave (15 animales). Dicha clasificación se estableció en base a que si un animal muestra déficits importantes en su capacidad de orientación (Tiempo de permanencia en la zona interior) o muestra déficits motores y sensoriales graves (Escala de valoración sensitivo-motora) obteniendo la clasificación de lesión grave en cualquiera de los dos test es porque su lesión cerebral es mayor que la de un animal que obtuvo la clasificación de lesión media en ambos test. Por lo tanto los animales con lesión cerebral grave fueron aquellos que cumplieron al menos uno de los siguientes criterios:

- Escala de valoración sensitivo-motora: puntuación mayor de 10.
- Tiempo de permanencia en la zona interior: permanecen un tiempo mayor de 15 segundos en la zona interior del cubículo de estudio.

### 3. INFLUENCIA DE LA GRAVEDAD DE LA LESIÓN EN LA EFICACIA DE LA TERAPIA CELULAR

#### 3.1. ESTABLECIMIENTO DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES

Para poder realizar la comparación de la eficacia de la terapia celular según la gravedad de la lesión neurológica se utilizaron los datos obtenidos en el apartado anterior.

Dentro de los niveles de lesión media y lesión grave se repartieron aleatoriamente los animales derivando aproximadamente el 50% al grupo de tratamiento con CMM mientras que el otro 50% al grupo de animales control (suero salino). Finalmente, el número final de animales incluido en el grupo tratado con CMM tanto en el nivel de lesión media como de lesión moderada, se realizó atendiendo al número total de células obtenido. El número real de animales dentro de cada grupo experimental y el tratamiento específico administrado dentro de cada nivel se resume en la **Tabla 14** y fue:

Déficit neurológico	Número de animales	Grupos experimentales
Lesión leve	N=6	Animales retirados del estudio
Lesión media	N=29	<b>CMM</b> n=14 <b>Suero salino</b> n=15
Lesión grave	N=15	<b>CMM</b> n=6 <b>Suero salino</b> n=9

**Tabla 14:** Número de animales utilizado dentro de cada grupo experimental y el tratamiento específico administrado.

- Grupo lesión media (N=6): Animales retirados del estudio.
- Grupo lesión media (N=29):
  - o Grupo 1 (N=14): trasplante intralesional de 5 millones de CMM.
  - o Grupo 2 (N=15): trasplante intralesional de suero fisiológico,
- Grupo lesión grave (N=15):
  - o Grupo 3 (N=6): trasplante intralesional de 5 millones de CMM.
  - o Grupo 4 (N=9): trasplante intralesional de suero fisiológico.

### 3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS CMM

Al igual que sucedía en la PARTE I del presente estudio, todos los cultivos de CMM obtenidas del estroma de médula ósea de las ratas macho Wistar donantes cumplieron los criterios de selección definidos en la **Tabla 7** del Material y Métodos.

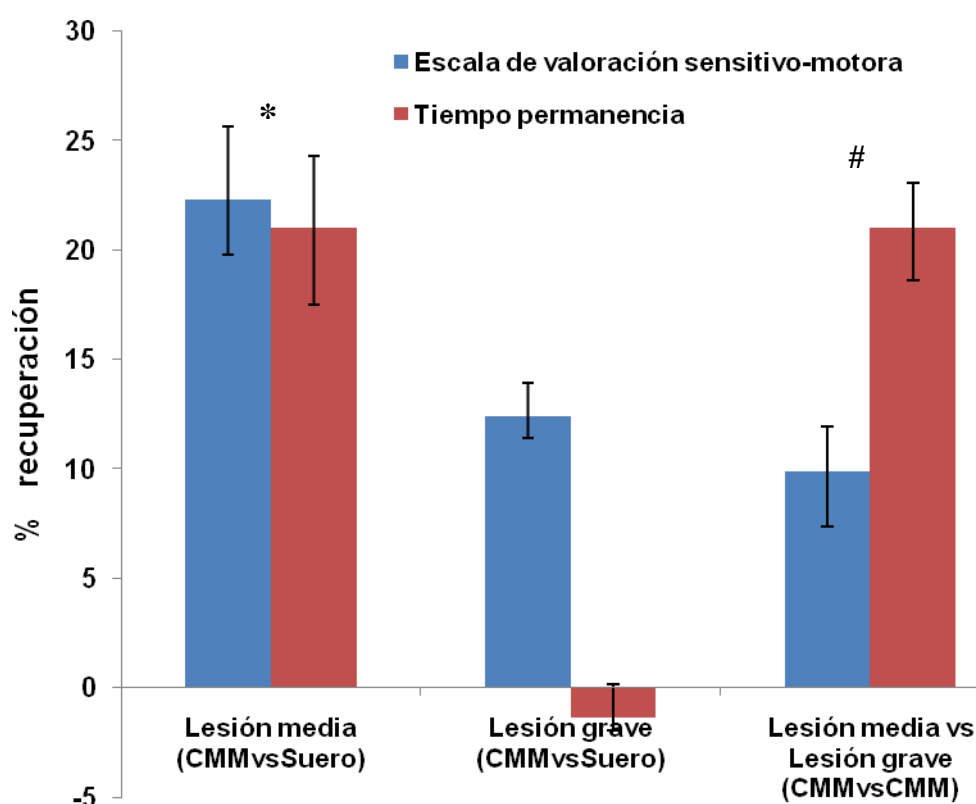
### 3.3. VALORACIÓN NEUROLÓGICA

Transcurridos dos meses desde los tratamientos (cuatro meses desde el trauma cerebral experimental), se obtuvieron resultados de los 2 métodos de valoración funcional (Escala de valoración sensitivo-motora y Tiempo de permanencia en la zona interior del área de estudio, VTB test).

Los resultados obtenidos corresponden a los 4 grupos experimentales anteriormente definidos que forman parte del estudio de la eficacia de la terapia celular en relación al nivel de déficit neurológico crónico (lesión media y lesión grave, animales tratados con CMM o suero salino; ya que los animales con lesión leve fueron anteriormente retirados del estudio).

Todos los datos obtenidos en el transcurso de la realización del estudio de la eficacia de la terapia celular en función del nivel de lesión cerebral se representaron en función del porcentaje de recuperación para una mejor comprensión de los resultados obtenidos. Se muestra como un 100% el estado basal de los animales y como un 0% el estado de los animales una vez transcurridos los dos meses desde la realización de la lesión y antes de realizar los tratamientos.

En la **Figura 28** se muestra un histograma donde se representa el porcentaje de recuperación obtenido al final del estudio comparando tratamientos (CMM o Suero) dentro del mismo nivel de lesión (Lesión media o Lesión grave) y el tratamiento con CMM entre los dos niveles de lesión.



**Figura 28:** Porcentaje de recuperación final obtenido al final de estudio con la Escala de valoración sensitivo-motora y el Tiempo de permanencia en la zona interior al comparar la eficacia del tratamiento dentro del nivel de Lesión media y de lesión grave, y la eficacia del tratamiento en función del nivel de lesión (\* $p \leq 0.05$  entre tratamientos dentro del mismo nivel de lesión; #  $p \leq 0.05$  comparando el mismo tratamiento entre los dos niveles de lesión).

### **a) Escala de valoración sensitiva-motora**

Los datos obtenidos con la Escala de valoración sensitiva-motora se muestran en la **Figura 28 y 29**.

#### **a. Lesión media:**

Al analizar los datos correspondientes a la evolución de los animales con lesión media se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en la semana 6 y 8 tras la administración de los tratamiento entre el grupo tratado con CMM y el grupo control (\* $p \leq 0.05$ ). Se obtuvo un porcentaje de recuperación final de 22,3% al final del estudio en relación a la Escala de valoración sensitivo-motora entre los animales tratados con CMM y los controles en el grupo de lesión media (**Figura 28 y 29**).

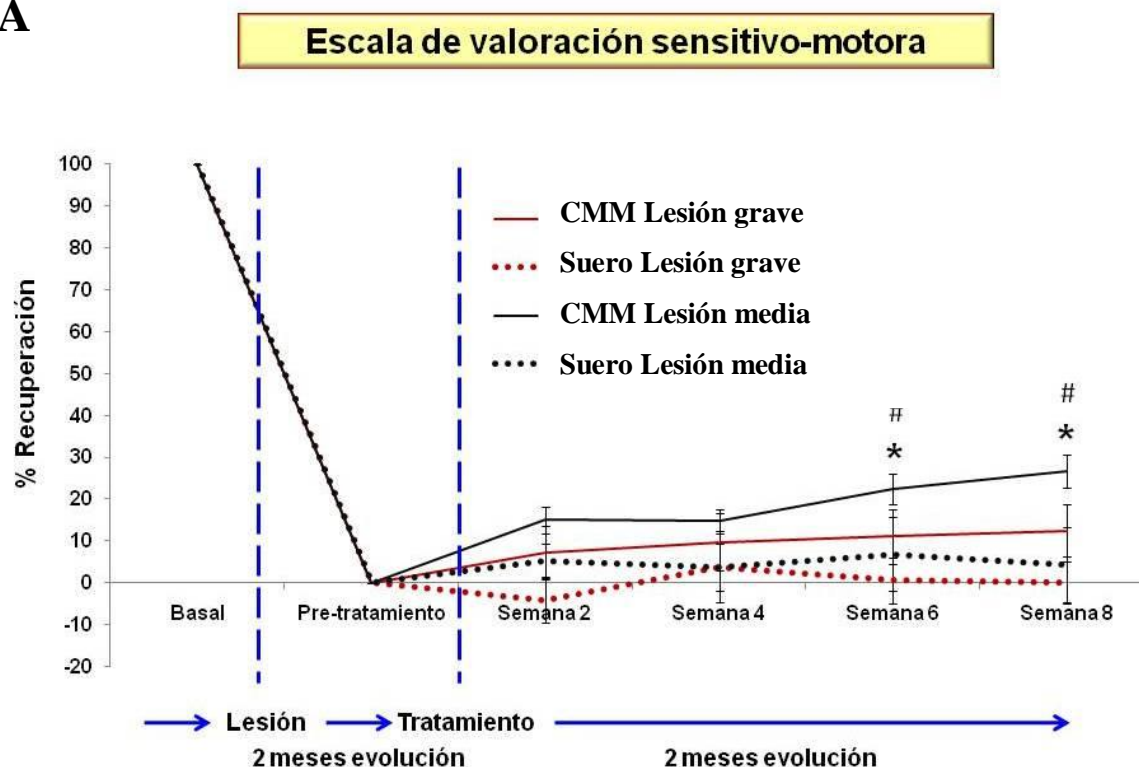
#### **b. Lesión grave:**

Los animales con una lesión grave tratados con CMM mostraron una evolución muy similar con respecto a sus controles, donde estadísticamente no se obtuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en ninguno de los puntos del estudio. El porcentaje de recuperación final fue de 12,4% al final del estudio en relación a la Escala de valoración sensitiva-motora entre los animales tratados con CMM y los controles en el grupo de lesión grave (**Figura 28 y 29**).

#### **c. Comparación entre lesión media y lesión grave:**

Se detectaron diferencias significativas entre los grupos lesión media y lesión grave de los animales tratados con CMM en las semanas 6 y 8 del estudio (# $p \leq 0.05$ ). El porcentaje de recuperación final de los animales tratados con CMM del grupo de lesión media fue de 9,9% en relación a los animales del grupo de lesión grave que recibieron también el trasplante de CMM (**Figura 28 y 29**).

A



B

## ESCALA DE VALORACIÓN SENSITIVO-MOTORA

Grupos experimentales		EVOLUCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS (% recuperación)					
		Basal	Pre-tratamiento	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8
Lesión media	CMM	100	0	15,01±3,30	14,68± 2,84	22,47± 3,66	26,65± 4,35
	SUERO	100	0	5,22± 4,06	3,87± 8,48	6,86± 8,85	4,35± 8,84
Lesión grave	CMM	100	0	7,19± 6.33	9,79± 6,73	11,15± 6.55	12,51± 6.29
	SUERO	100	0	-4,14± 5.48	3,66± 5.70	0,60± 5.46	0,11± 5.00

**Figura 29:** Escala de valoración sensitivo-motora: **A**, grafica evolutiva y **B**, tabla de datos (\* $p \leq 0.05$  entre tratamientos dentro del mismo nivel de lesión; # $p \leq 0.05$  comparando el mismo tratamiento entre los dos niveles de lesión).

## **b) Tiempo de permanencia en la zona interior (VTB test)**

En la **Figura 30** se muestra un ejemplo de las imágenes captadas y analizadas a través del VTB test de cada uno de los grupos experimentales incluidos en el estudio, mientras que los datos correspondientes al Tiempo de permanencia en la zona interior del área de estudio se muestran en la **Figura 28 y 31**.

### **a. Lesión media**

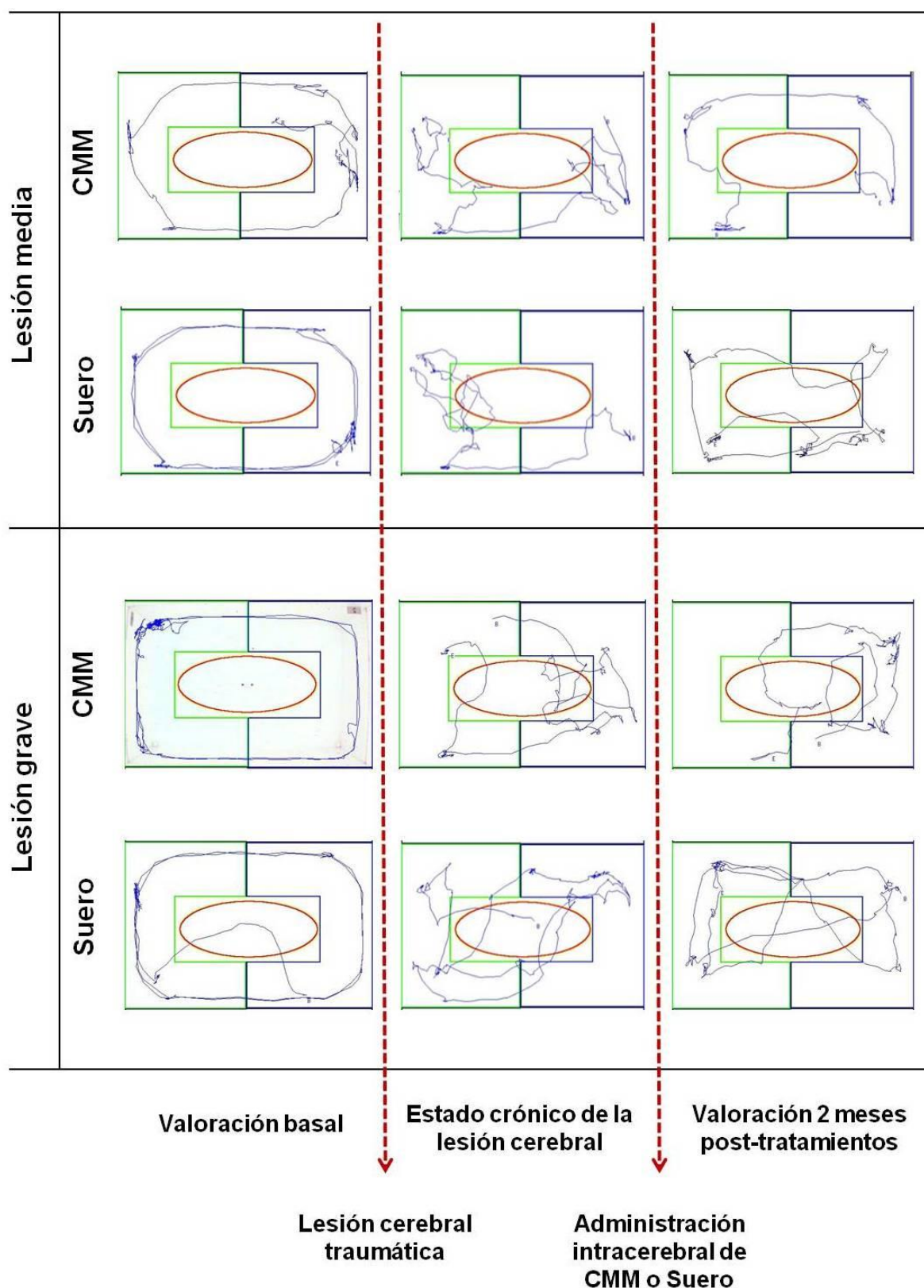
Se detectaron diferencias significativas en la semana 8 entre el grupo tratado con células y el grupo control (\* $p \leq 0.05$ ). Se obtuvo un porcentaje de recuperación final de 20,98% al final del estudio en relación al Tiempo de permanencia en el interior del área de estudio entre los animales tratados con CMM y los controles en el grupo de lesión media (**Figura 28 y 31**).

### **b. Lesión grave**

La evolución de los animales con lesión grave tratados con células y sus controles fue muy similar, no detectándose diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los puntos analizados ( $p > 0.05$ ). El porcentaje de recuperación final fue de -1,34% al final del estudio entre los animales tratados con CMM y los controles en el grupo de lesión grave (**Figura 28 y 31**).

### **c. Comparación entre lesión media y lesión grave:**

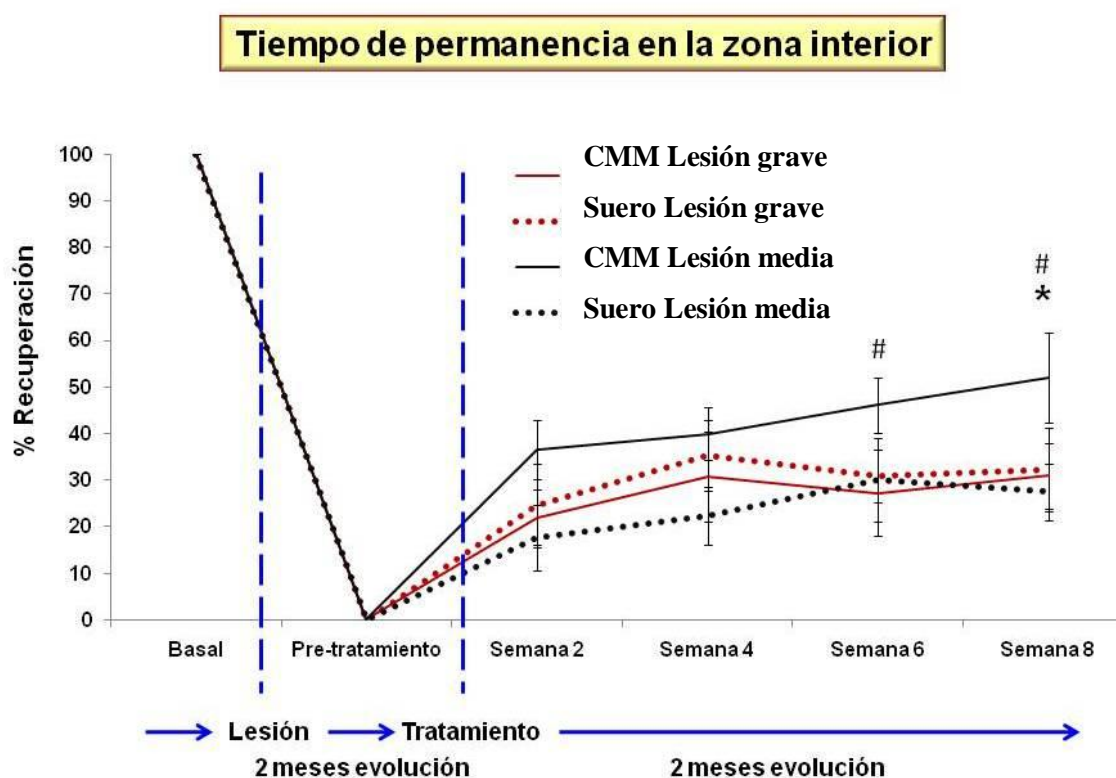
Por otro lado, al igual que en el análisis de los datos de la Escala de valoración sensitivo-motora, también se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo lesión media y lesión grave de los animales tratados con CMM en las semanas 6 y 8 tras el tratamiento (# $p \leq 0.05$ ). El porcentaje de recuperación final de los animales tratados con CMM del grupo de lesión media fue de 21,01% respecto a los animales del grupo de lesión grave que recibieron también el trasplante de CMM (**Figura 28 y 31**).



**Figura 30:** Imágenes obtenidas con el VTB test de la valoración basal, estado crónico de los animales con lesión cerebral traumática y estado neurológico dos meses después de recibir el tratamiento correspondiente de los cuatro grupos experimentales incluidos en el estudio.



A



B

TIEMPO DE PERMANENCIA (VTB test)

Grupos experimentales		EVOLUCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS (%)					
		Basal	Pre-tratamiento	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8
Lesión media	CMM	100	0	36,51±6,31	39,95±5,61	46,11±5,92	51,98±9,65
	SUERO	100	0	17,64±7,10	22,31±6,26	30,08±9,06	31,00±6,06
Lesión grave	CMM	100	0	22,04±6,01	30,78±9,74	27,27±9,35	30,97±7,00
	SUERO	100	0	24,61±8,94	35,36±7,54	30,88±5,71	32,31±8,99

**Figura 31:** Tiempo de permanencia en la zona interior del área de estudio: **A**, grafica evolutiva y **B**, tabla de datos (\* $p \leq 0.05$  entre tratamientos dentro del mismo nivel de lesión; #  $p \leq 0.05$  comparando el mismo tratamiento entre los dos niveles de lesión).

## 4. RESULTADOS HISTOLÓGICOS

Al finalizar el estudio y tras eutanasiar a los animales se realizó el estudio macroscópico e inmunohistoquímico de la zona de lesión con el fin de intentar comprobar posibles cambios a nivel tisular asociados a la terapia celular y el nivel de lesión cerebral.

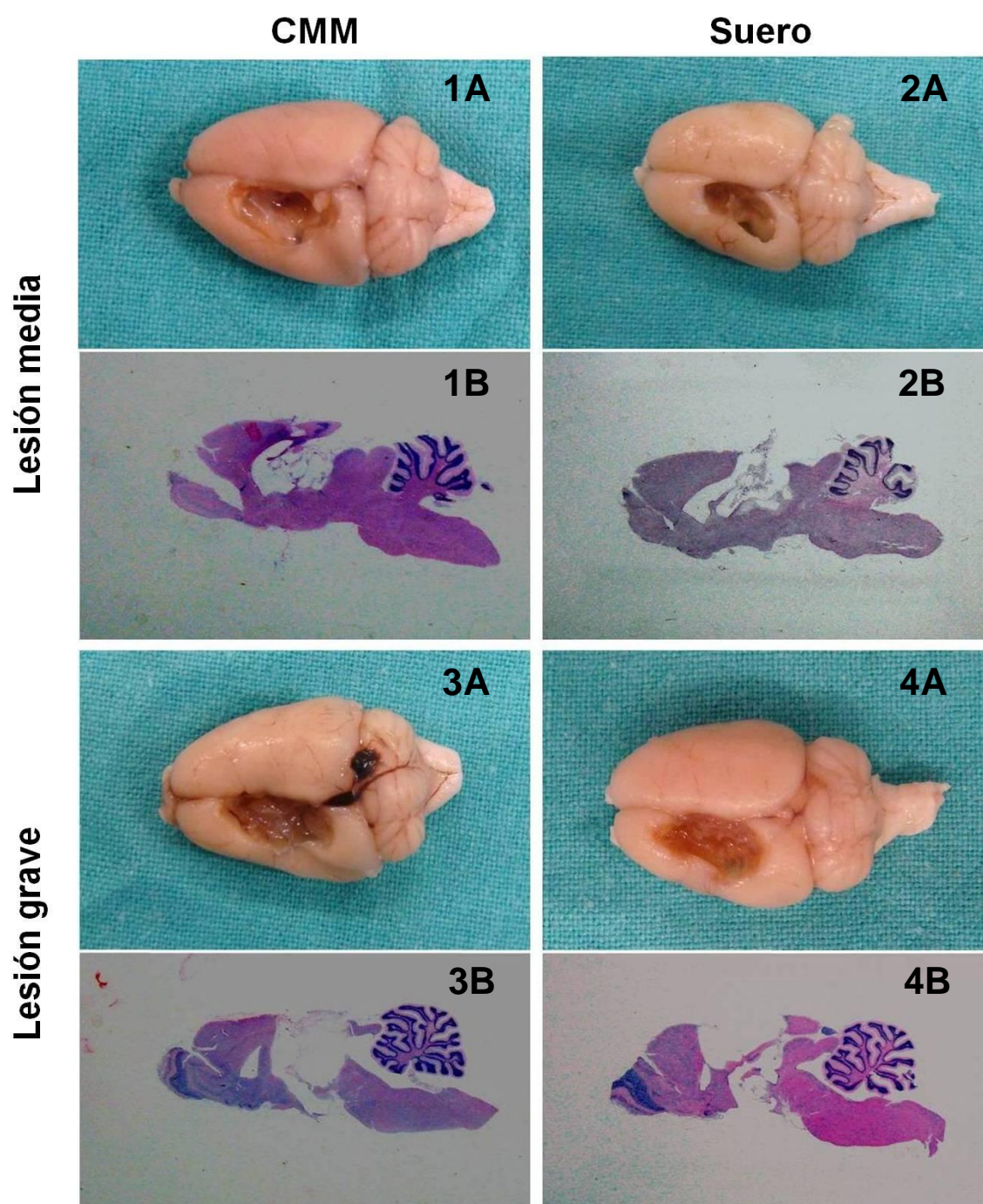
### 4.1. ESTUDIOS MACROSCÓPICOS

#### a) Estudios histológicos

En los grupos de lesión media como de lesión grave (tanto en los animales tratados con CMM como con suero) se observó una gran contusión sobre la corteza parietal que se extiende ventralmente formando una profunda cavidad (**Figura 32: 1A, 2A, 3A y 4A**).

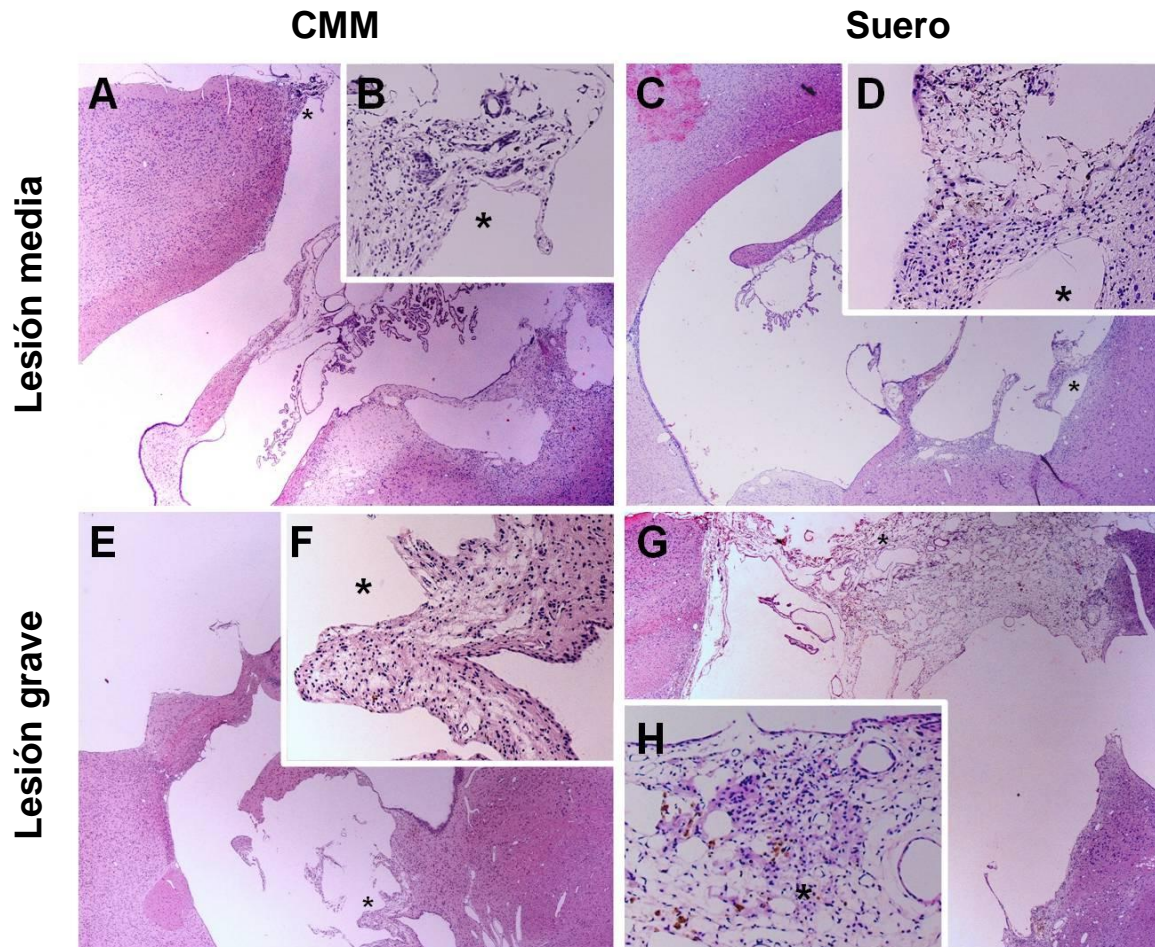
En el estudio cualitativo realizado sobre las preparaciones controles teñidas con Hematoxilina y Eosina se observó una gran superficie de tejido que mostraba ausencia total o parcial de la arquitectura normal de la superficie cortical cerebral, tanto en los niveles de lesión media como grave (**Figura 32: 1B, 2B, 3B y 4B**).

También se observaron las típicas secuelas asociadas con el daño cerebral traumático, como son la presencia de una gran cavidad necrótica parcialmente invadida por macrófagos, células inflamatorias y algunos astrocitos reactivos asociada a todos los grupos experimentales. Al estudiar las muestras no se detectaron diferencias evidentes en la arquitectura tisular entre los niveles lesión media y lesión grave, ni entre los animales tratados con CMM o los controles; aunque cualitativamente se observó un mayor número de macrófagos en los grupos controles de ambos niveles de lesión (**Figura 33**).



**Figura 32:** Estudio necroscópico de las muestras obtenidas donde se muestran ejemplos de cerebros de cada uno de los niveles de lesión donde se observa la cavidad postraumática (1A, 2A, 3A y 4A) y ejemplos de los cortes histológicos estudiados (1B, 2B, 3B y 4B).





**Figura 33:** Hematoxilina-Eosina de cortes histológicos de animales del grupo lesión media y lesión grave tratados con CMM o suero donde se muestra la cavidad postraumática (A, C, E y G) y un detalle del tejido cerebral (B, D, F y H). Magnificación: A, C, E y G 20X y B, D, F y H 100X.

#### b) Volumen de lesión

Los resultados obtenidos de la medida del volumen de lesión de los grupos estudiados se muestran en la **Figura 34**.

**a. Lesión media**

El volumen de lesión de los animales tratados con suero del grupo de lesión media fue mayor comparado con el volumen de la cavidad de los animales que recibieron CMM del mismo nivel de lesión ( $41,52 \pm 4,52$  respecto  $36,25 \pm 12,14$ ), aunque no fue estadísticamente significativo ( $p > 0,05$ ).

**b. Lesión grave**

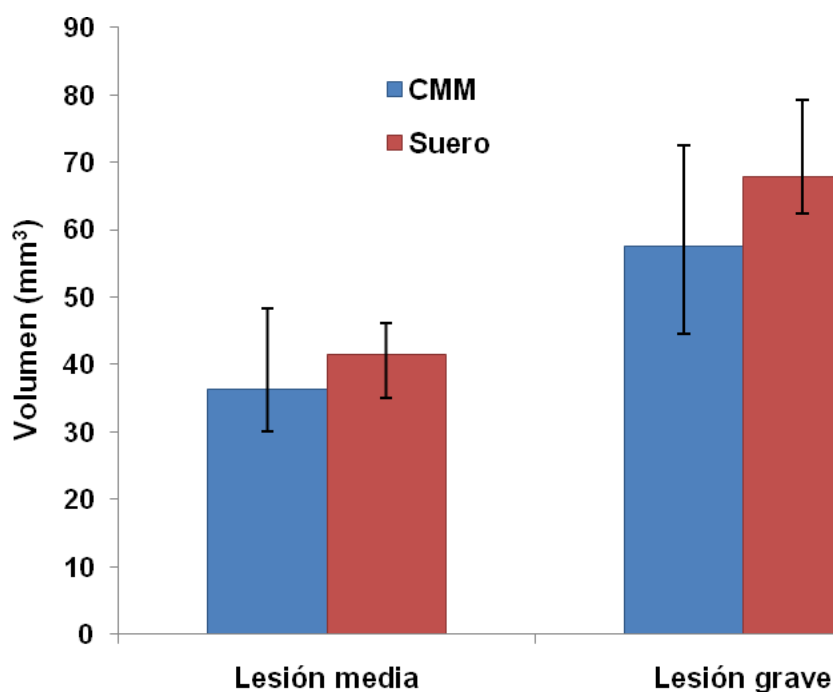
Al igual que sucedió en el caso anterior el volumen de lesión de los animales tratados con suero del grupo lesión grave fue mayor comparado con el volumen de la cavidad de los animales con lesión grave que recibieron CMM ( $67,84 \pm 17,41$  respecto  $57,56 \pm 18,97$ ), aunque tampoco se obtuvieron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0,05$ ).

**c. Comparación entre lesión media y lesión grave**

Los animales con lesión grave mostraron un volumen de lesión mayor que los animales con una lesión media dos meses después desde los tratamientos, y cuatro meses después de producir la lesión cerebral traumática.

Al comparar el tratamiento con suero entre los dos niveles de lesión se obtuvo un  $41,52 \pm 4,52$  en el grupo lesión media frente a un  $67,84 \pm 17,41$  en el grupo lesión grave aunque esta diferencia no fue acompañada de un nivel estadístico significativo ( $p > 0,05$ ).

Lo mismo sucedió al estudiar el efecto de las células entre los niveles de lesión donde se obtuvo un  $36,25 \pm 12,14$  en el grupo lesión media frente a un  $57,56 \pm 18,97$  en el grupo de lesión grave, sin obtenerse diferencias estadísticas significativas.

**A****B**

VOLUMEN DE LESIÓN		
Nivel de lesión	TIPO DE TRATAMIENTO	
	CMM	SUERO
Lesión media	36,25±12,14	41,52±4,52
Lesión grave	57,56±18,97	67,84±17,41

**Figura 34:** Volumen de lesión obtenido en los cuatro grupos experimentales utilizados donde se muestra: **A**, histograma y **B**, tabla de datos (\* $p \leq 0.05$  entre tratamientos dentro del mismo nivel de lesión; # $p \leq 0.05$  comparando el tratamiento con CMM entre los dos niveles de lesión).

	Comparación de la efectividad de los tratamientos	Lesión media		Lesión grave	
		CMM	Suero	CMM	Suero
NF-200	Comparación tratamientos del mismo nivel	NO EXISTEN diferencias cualitativas entre los tratamientos		NO EXISTEN diferencias cualitativas entre los tratamientos	
	Comparación del mismo tratamiento entre niveles	NO EXISTEN diferencias cualitativas entre los <b>tratamientos de CMM</b> NO EXISTEN diferencias cualitativas entre los <b>tratamientos con suero</b>			
PGFA	Comparación tratamientos del mismo nivel	NO EXISTEN diferencias cualitativas entre los tratamientos		NO EXISTEN diferencias cualitativas entre los tratamientos	
	Comparación del mismo tratamiento entre niveles	NO EXISTEN diferencias cualitativas entre los <b>tratamientos de CMM</b> NO EXISTEN diferencias cualitativas entre los <b>tratamientos con suero</b>			
Nestina	Comparación tratamientos del mismo nivel	EXISTEN diferencias cualitativas entre los tratamientos		EXISTEN diferencias cualitativas entre los tratamientos	
	Comparación del mismo tratamiento entre niveles	NO EXISTEN diferencias cualitativas entre los <b>tratamientos de CMM</b> NO EXISTEN diferencias cualitativas entre los <b>tratamientos con suero</b>			
Dcx	Comparación tratamientos del mismo nivel	EXISTEN diferencias cualitativas entre los tratamientos		EXISTEN diferencias cualitativas entre los tratamientos	
	Comparación del mismo tratamiento entre niveles	NO EXISTEN diferencias cualitativas entre los <b>tratamientos de CMM</b> NO EXISTEN diferencias cualitativas entre los <b>tratamientos con suero</b>			
Ki-67	Comparación tratamientos del mismo nivel	EXISTEN diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos		EXISTEN diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos	
	Comparación del mismo tratamiento entre niveles	EXISTEN diferencias estadísticamente significativas entre los <b>tratamientos de CMM</b> NO EXISTEN diferencias estadísticamente significativas entre los <b>tratamientos con suero</b>			

**Tabla 15:** Resumen de los resultados inmunohistoquímicos obtenidos en el presente estudio comparando el marcaje entre tratamientos dentro de cada nivel de lesión y comparando el mismo tratamiento entre los dos niveles de lesión.

## 4.2. RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS DE LA ZONA DE LESIÓN

En la **Tabla 15** se muestra un resumen de los resultados inmunohistoquímicos obtenidos en el presente estudio y que se detallan a continuación:

### a) Marcadores neuronales y gliales

Los resultados obtenidos del estudio cualitativo bajo microscopía óptica convencional de los marcadores neuronales y gliales (NF-200 y PGFA respectivamente) de la zona de lesión de los animales tratados con CMM y con suero correspondientes a los niveles de lesión cerebral media y grave fueron los siguientes:

#### a. NF-200

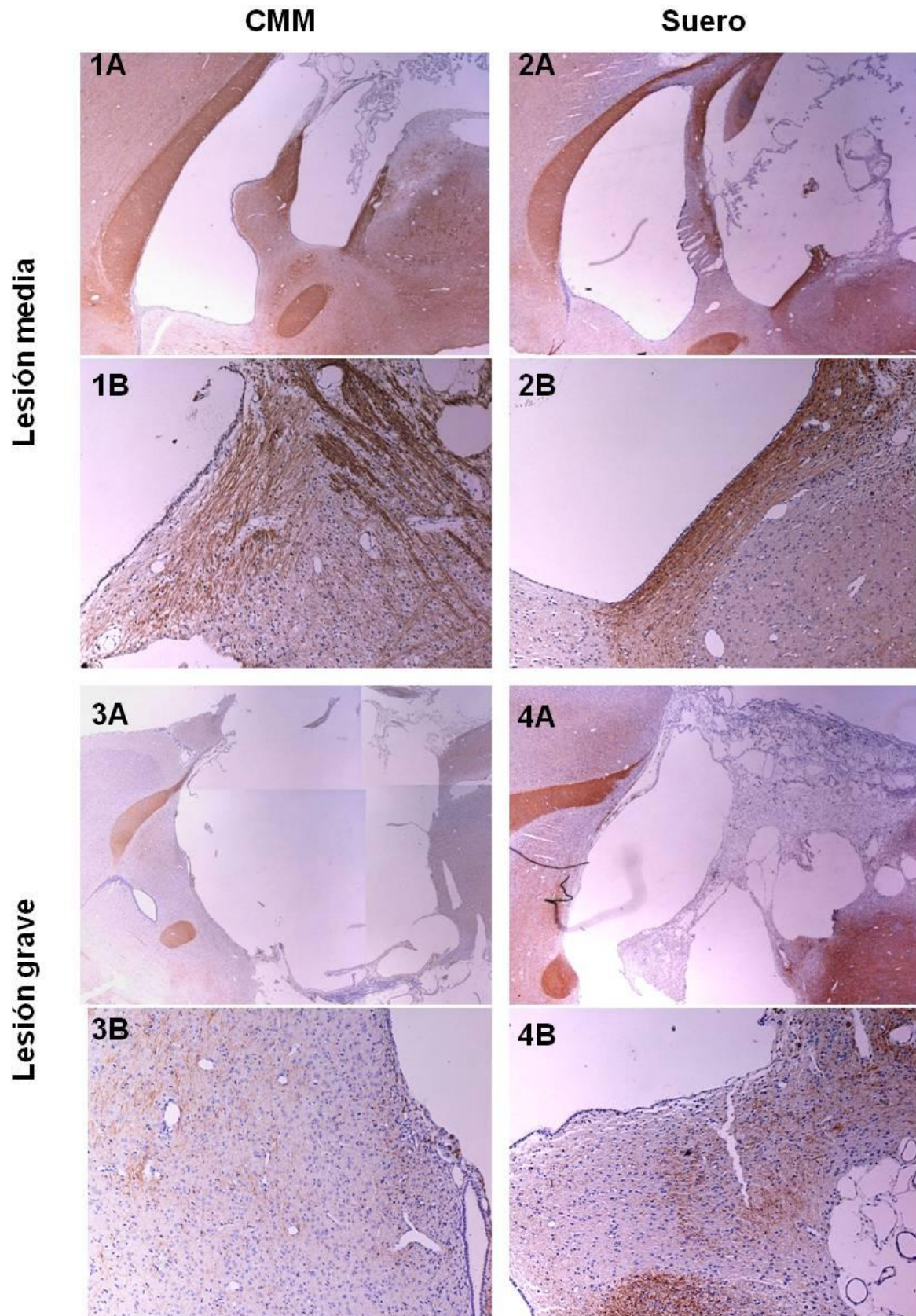
En la **Figura 35** se muestran ejemplos del marcador NF-200 de los cuatro grupos experimentales estudiados. Se obtuvo un marcaje uniforme y similar en todas las muestras estudiadas para el marcaje de NF-200.

No se detectaron diferencias evidentes entre los animales tratados con CMM y suero fisiológico en ninguno de los dos niveles de estudio (lesión media y lesión grave). Por otro lado, tampoco se observaron diferencias evidentes al estudiar las muestras correspondientes al mismo tratamiento entre los dos grupos de lesión. Por lo tanto el marcaje resultó muy similar en los 4 grupos experimentales incluidos en el estudio.

#### b. PGFA

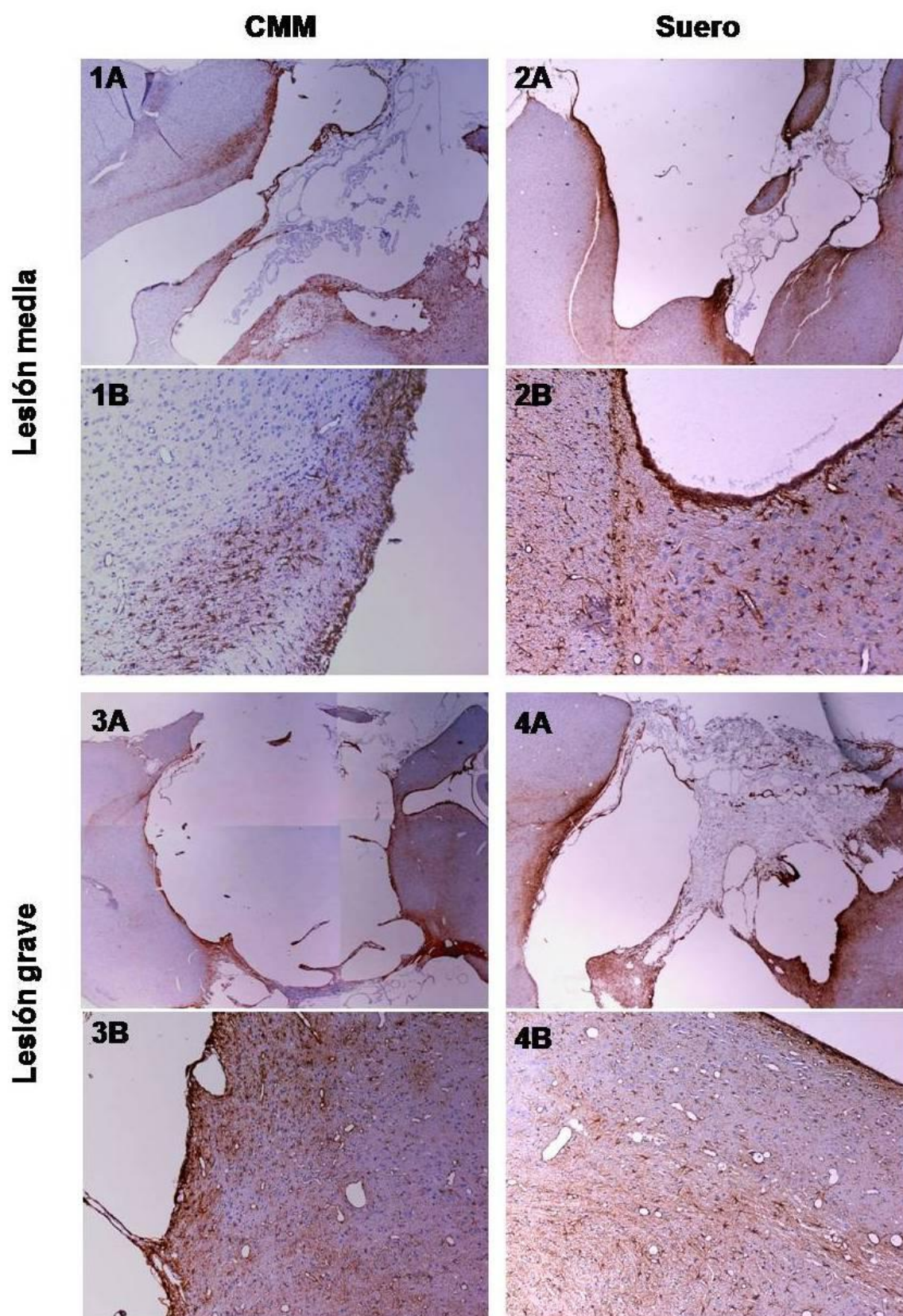
El análisis de la expresión de PGFA mostró un resultado muy similar al obtenido con el estudio de la expresión de NF-200, en la **Figura 36** se muestran ejemplos de los resultados obtenidos.





**Figura 35:** Ejemplos del marcaje con NF-200 de cortes histológicos de animales del grupo lesión media y lesión grave tratados con CMM o Suero donde se muestra la cavidad postraumática (1A, 2A, 3A y 4A) y un detalle del tejido cerebral en el borde de la lesión (1B, 2B, 3B y 4B). Magnificación: 1A, 2A, 3A y 4A 20X; y 1B, 2B, 3B y 4B 100X.





**Figura 36:** Ejemplos del marcaje con PGFA de cortes histológicos de animales del grupo lesión media y lesión grave tratados con CMM o Suero donde se muestra la cavidad postraumática (**1A**, **2A**, **3A** y **4A**) y un detalle del tejido cerebral en el borde de la lesión (**1B**, **2B**, **3B** y **4B**). Magnificación: 1A, 2A, 3A y 4A 20X; y 1B, 2B, 3B y 4B 100X.

En el estudio de la expresión de PGFA de las muestras del grupo lesión media de los animales tratados con CMM y con suero no mostró diferencias evidentes, lo mismo ocurrió al estudiar las muestras de los animales del grupo lesión grave (CMM y suero). Tampoco se detectaron diferencias al comparar el mismo tratamiento (CMM o suero) entre los dos grupos de lesión.

Por lo tanto, no se detectaron diferencias en la expresión de PGFA entre los animales tratados con CMM y suero dentro de cada nivel de lesión, ni entre el mismo tratamiento comparando ambos niveles de lesión.

## **b) Estudio de neurogénesis**

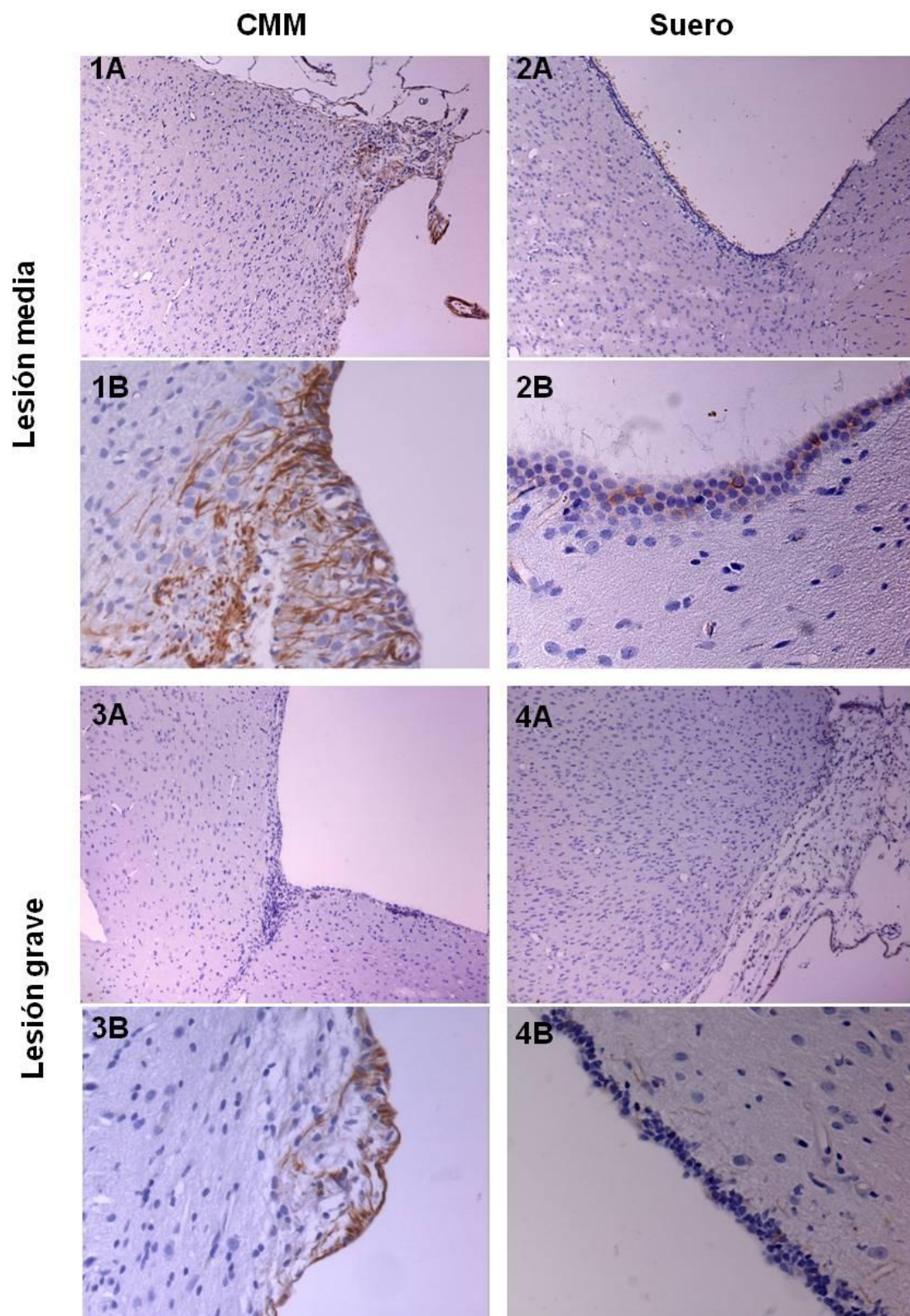
Para poder comprobar la utilidad del trasplante de CMM como mecanismo de activación de la neurogénesis endógena y como dicha expresión puede estar relacionada con el tratamiento administrado y el nivel de lesión cerebral crónico se estudiaron los resultados obtenidos con el marcaje de Nestina y Dcx.

### **a. Nestina**

Los resultados obtenidos del estudio cualitativo bajo microscopía óptica convencional del marcador Nestina en los cuatro grupos experimentales mostró un patrón de expresión diferente dentro de los niveles de lesión. En la **Figura 37** se muestran imágenes de los dos niveles de lesión estudiados.

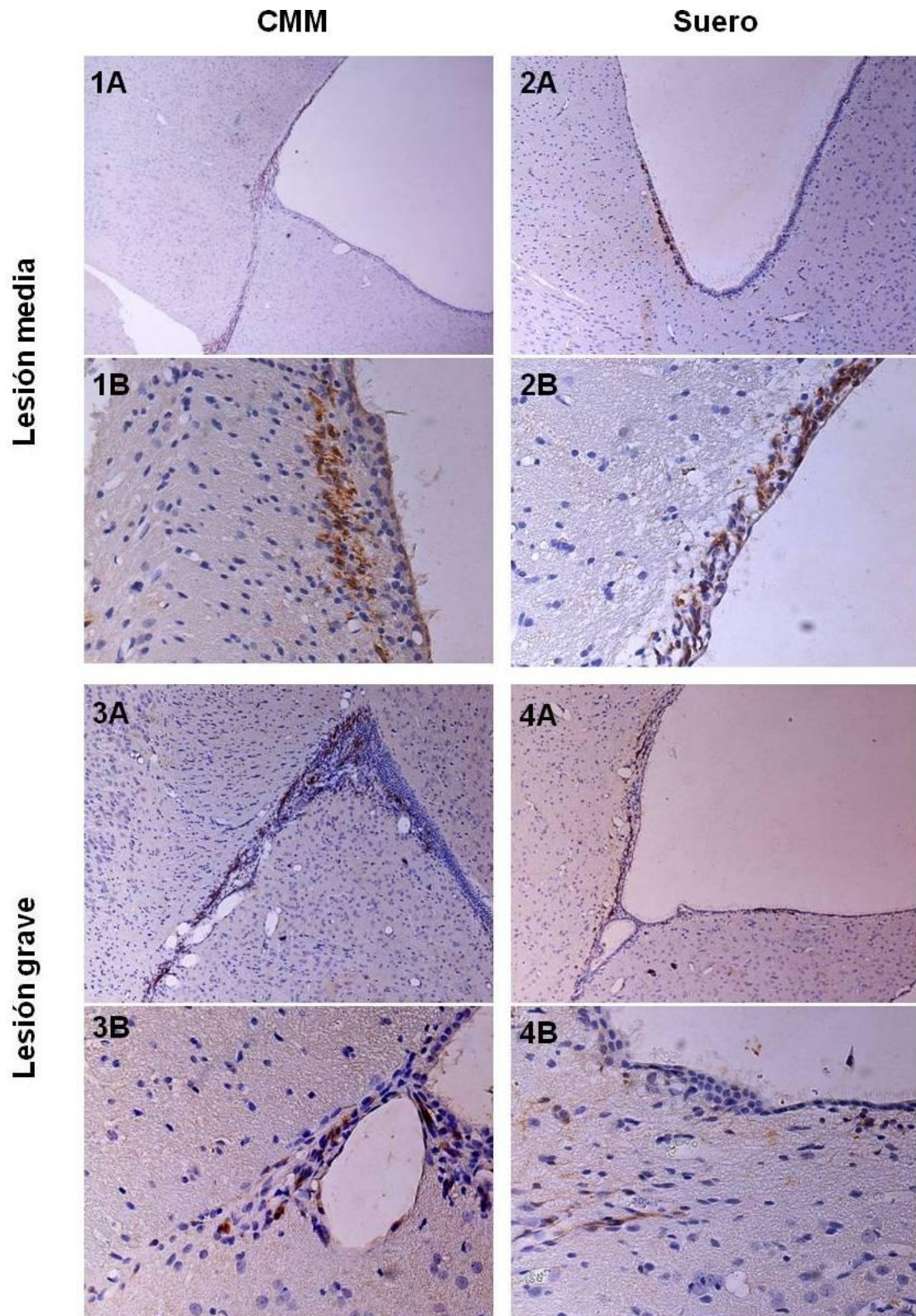
Se observó un incremento en la positividad a Nestina en las muestras pertenecientes a los tratamientos con CMM respecto de los animales tratados sólo con suero tanto en el grupo de lesión media como en el grupo de lesión grave. Por otro lado, no se detectaron diferencias evidentes al comparar los animales tratados con CMM del nivel de lesión media y los animales tratados con CMM del nivel lesión grave, ni al comparar los animales tratados con suero de ambos niveles de lesión cerebral.





**Figura 37:** Ejemplos del marcaje con Nestina de cortes histológicos de animales del grupo lesión media y lesión grave tratados con CMM o Suero donde se muestra la cavidad postraumática (1A, 2A, 3A y 4A) y un detalle del tejido cerebral en el borde de la lesión (1B, 2B, 3B y 4B). Magnificación: 1A, 2A, 3A y 4A 20X; y 1B, 2B, 3B y 4B 100X.





**Figura 38:** Ejemplos del marcaje con Dcx de cortes histológicos de animales del grupo lesión media y lesión grave tratados con CMM o Suero donde se muestra la cavidad postraumática (1A, 2A, 3A y 4A) y un detalle del tejido cerebral en el borde de la lesión (1B, 2B, 3B y 4B). Magnificación: 1A, 2A, 3A y 4A 20X; y 1B, 2B, 3B y 4B 100X.

### **b. Dcx**

El estudio de la expresión de Dcx de los 4 grupos experimentales mostró los mismos resultados que los descritos para la expresión de Nestina. En la **Figura 38** se muestran imágenes de los resultados obtenidos.

Se detectaron diferencias en la expresión de Dcx entre los animales tratados dentro de cada grupo de lesión (lesión media y lesión grave), donde se observó una mayor positividad a Dcx en los animales tratados con CMM respecto de los controles, y por otro lado, no se detectaron diferencias entre los animales tratados con CMM y suero entre ambos niveles de lesión.

### **c) Estudio de proliferación celular**

En cuanto al recuento de aquellas células que se encuentran en proliferación (Ki-67), se observaron diferencias en ambos niveles de lesión entre el tratamiento con CMM y Suero salino.

En la **Figura 39** se muestran ejemplos de la inmunohistoquímica a Ki-67, mientras que en la **Figura 40** se muestra el recuento total de células Ki-67<sup>+</sup> según el tratamiento recibido dentro de los grupos de lesión media y lesión grave, y cuyos resultados se detallan a continuación:

#### **a. Lesión media**

En el grupo de lesión media el recuento de células Ki-67<sup>+</sup> de los animales que recibieron CMM fue de un  $89,67 \pm 3,45$  mientras que en aquellos animales que recibieron suero fue de un  $17,01 \pm 5,62$ , obteniéndose diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0,05$ ).

#### **b. Lesión grave**

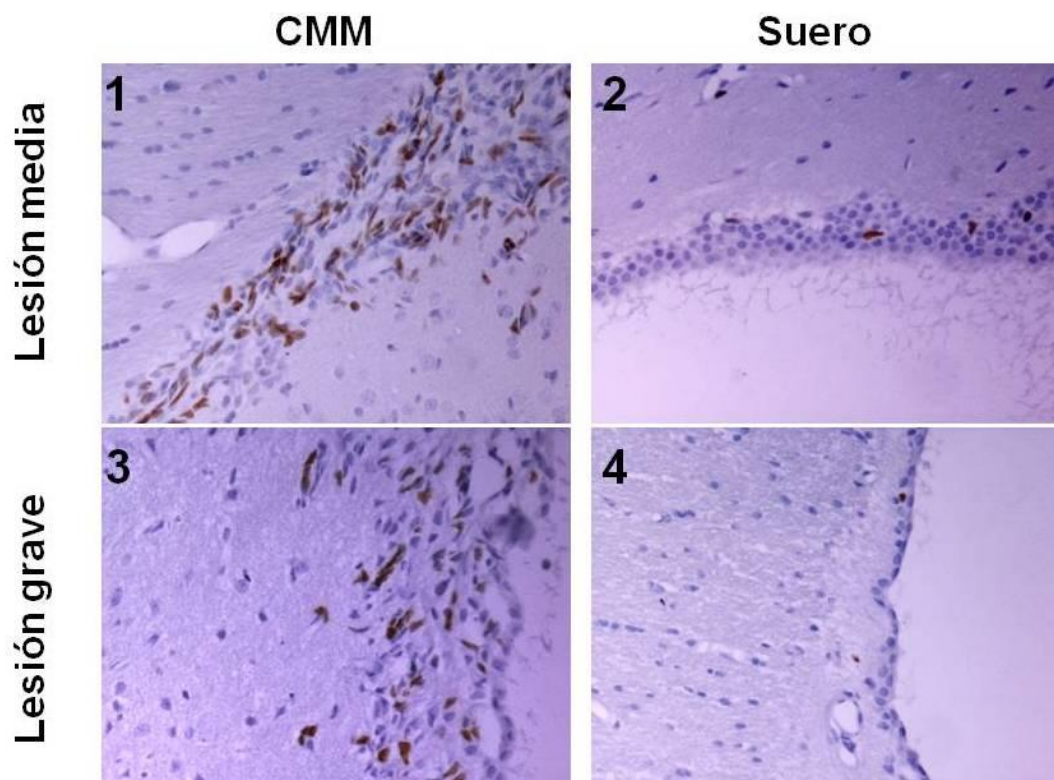
En el grupo de lesión grave, el recuento de células en proliferación total fue de  $66,66 \pm 6,99$  en aquellos animales que recibieron el tratamiento con CMM

mientras que en los animales controles el recuento fue de  $6,99 \pm 1,82$  células, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas ( $*p < 0,05$ ) al igual que sucedía en el caso anterior.

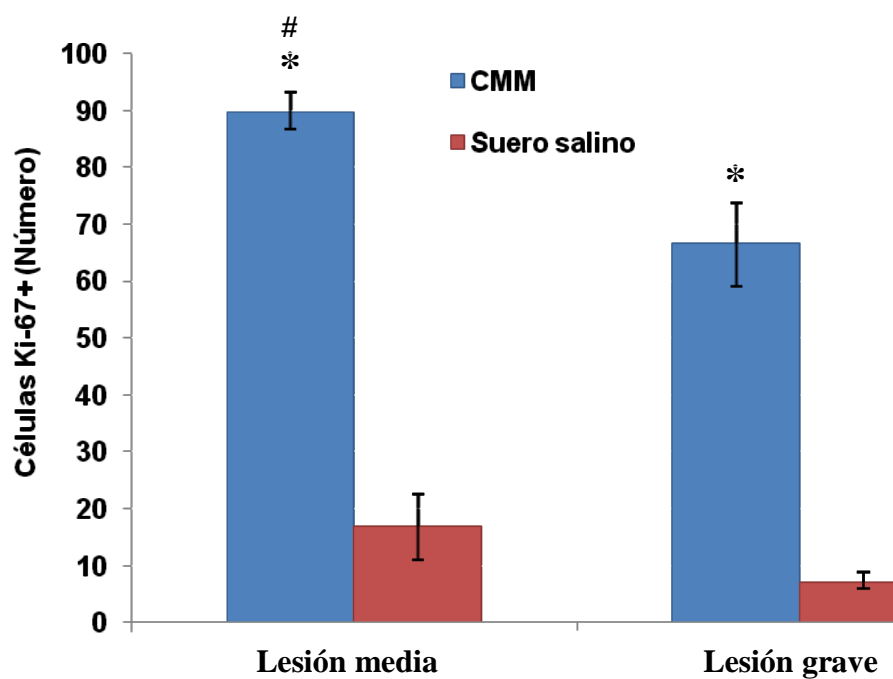
### c. Comparación entre lesión media y lesión grave

Por otro lado, también se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $\#p < 0,05$ ) entre ambos grupos en los animales que recibieron el tratamiento con CMM ( $89,67 \pm 3,45$  en los animales tratados con CMM del grupo lesión media respecto  $66,66 \pm 6,99$  en los animales tratados con CMM pertenecientes al grupo de lesión grave).

No se detectaron diferencias significativas ( $*p > 0,05$ ) al comparar el número de células Ki-67<sup>+</sup> de los animales controles del grupo de lesión media y los animales controles del grupo de lesión grave ( $17,01 \pm 5,62$  y  $6,99 \pm 1,82$  células respectivamente).



**Figura 39:** Ejemplos de células proliferantes positivas a Ki-67 de cortes histológicos de animales del grupo lesión media y lesión grave tratados con CMM o Suero. Magnificación 200X.

**A****B**

EXPRESIÓN DE KI-67		
Nivel de lesión	TIPO DE TRATAMIENTO	
	CMM	SUERO
Lesión media	89,67±3,45	17,01±5,62
Lesión severa	66,66±6,99	6,99±1,82

**Figura 40:** Número de células positivas a Ki-67 obtenido en los cuatro grupos experimentales utilizados donde se muestra: **A**, histograma y **B**, tabla de datos.

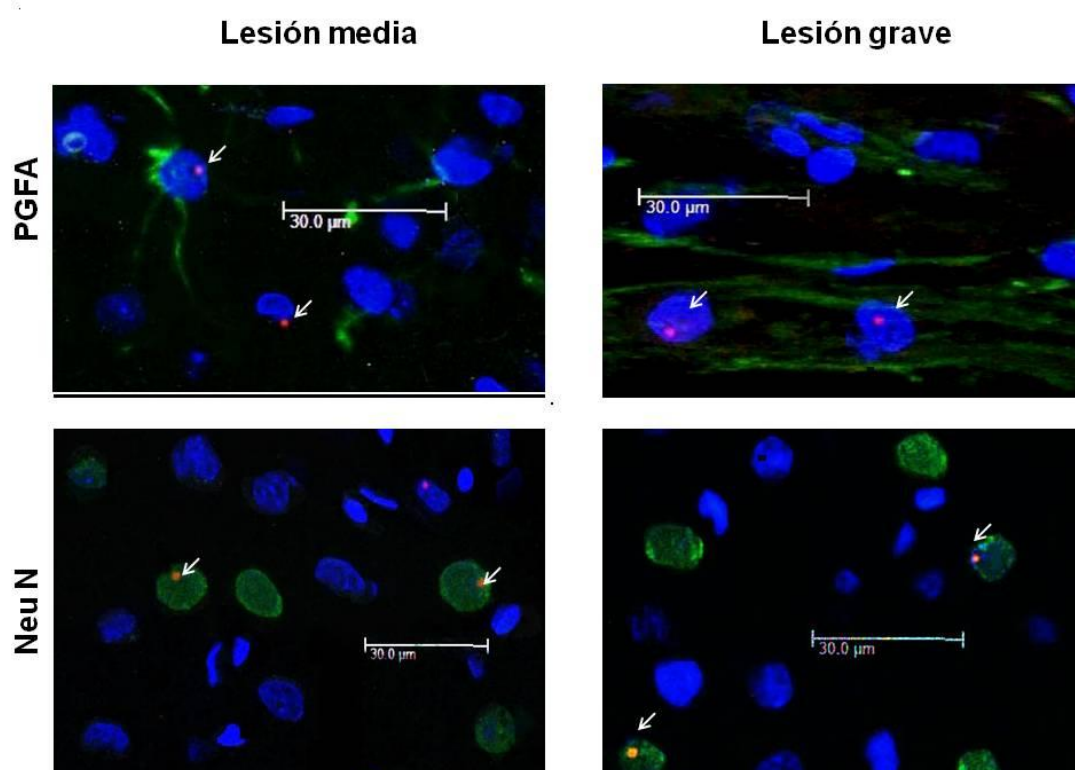


## d) Resultados de Microscopía confocal

### a. Localización de las células trasplantadas

Los estudios de Hibridación In Situ para la detección del gen Sry de las CMM trasplantadas, mostraron un número variable de dichas células distribuidas por todos los bordes de la cavidad post-traumática, localizándose principalmente en la zona de la lesión.

Se detectaron células positivas al gen Sry tanto en los animales del grupo de lesión media como en los animales del grupo de lesión grave, no detectándose diferencias en el número de células trasplantadas en ambos grupos. No se detectaron células positivas al gen Sry en los animales controles.



**Figura 41:** Localización de las células trasplantadas expresando marcadores típicos de células neuronales (Neu-N) o gliales (PGFA) en animales sometidos a terapia celular con CMM del grupo de lesión media (A, C) y del grupo de lesión grave (B, D).

**b. Expresión de marcadores neurales de las CMM trasplantadas**

Los resultados obtenidos en los estudios realizados de Hibridación In Situ junto con la expresión de marcadores neuronales y gliales se muestran en la **Figura 41**.

Se localizaron células positivas al gen Sry de las células trasplantadas que co-expresaban Neu-N o PGFA dentro de la zona de lesión tanto en animales del grupo de lesión media como en animales del grupo de lesión grave. No se detectaron diferencias en el número de células trasplantadas que expresaban marcadores neuronales o gliales según el nivel de lesión cerebral.

# DISCUSIÓN

---

## DISCUSIÓN

---

### 1. CONSIDERACIONES GENERALES

Actualmente el trauma cerebral es la principal causa de muerte y discapacidad en personas menores de 25 años de edad (Thurman and Guerrero, 1999; Bruns et al, 2003; Langlois et al, 2006; Tagliaferri et al, 2006), una vez que se ha estabilizado el daño cerebral no hay terapias efectivas para intentar recuperar la función neurológica, salvo la rehabilitación y algunos cuidados básicos paliativos (Narayan et al, 2002; Royo et al, 2003; Beauchamp et al, 2008). Por todo esto, el TCE supone un gran problema de salud pública, así como un gran gasto económico. El desarrollo de tratamientos efectivos para tratar a estos pacientes es una línea terapéutica prometedora con un gran potencial clínico y económico.

En un esfuerzo por intentar trasladar los resultados obtenidos con los estudios realizados en modelos experimentales de TCE a lo que sucede en la clínica humana, nos propusimos estudiar como la gravedad y magnitud de los déficits neurológicos permanentes resultantes de un trauma cerebral pueden influir en la posible eficacia de las terapias celulares. Para ello, desarrollamos un protocolo de terapia celular a través de la administración de CMM en un modelo animal de lesión traumática cerebral crónica, determinando si dicha terapia puede o no ser efectiva en el tratamiento de diferentes niveles de déficit neurológico permanente.

El desarrollo del presente estudio siguió una secuencia concreta para poder desarrollar los objetivos previamente definidos. Primero, comprobar la eficacia de la terapia celular con CMM para intentar revertir el déficit funcional secundario a una lesión traumática cerebral experimental en roedores. En segundo lugar, tratar de comprobar si la eficacia de dicha terapia puede verse

condicionada por el nivel de lesión cerebral de los animales. Por lo tanto, intentamos comprobar si el nivel de lesión neurológica puede influir en la recuperación de los animales sometidos a un protocolo de terapia celular a través de la administración de CMM.

## **2. MODELO EXPERIMENTAL DE LESIÓN TRAUMÁTICA CEREBRAL**

Durante el desarrollo del presente trabajo experimental, y en concreto con el modelo experimental de lesión utilizado, se consiguió obtener déficits funcionales medibles y cuantificables dos meses después de realizar la lesión traumática experimental. Dichas secuelas son semejantes a las que se han obtenido en diversos estudios de daño cerebral traumático experimental, pero no existen estudios que establezcan niveles de déficit neurológico en ratas con una lesión cerebral crónica.

### **2.1. DETERMINACIÓN DE NIVELES DE LESIÓN CEREBRAL**

Durante el desarrollo del presente estudio intentamos diseñar una escala de clasificación de diferentes niveles de déficit neurológico en un modelo experimental de lesión cerebral traumática previamente diseñado y desarrollado en ratas Wistar adultas y que consta de un complejo protocolo para aumentar la supervivencia y por tanto, el nivel de lesión de los animales.

La característica más prevalente en los supervivientes de un TCE son los déficits cognitivos y la disfunción motora, y dichos déficits son los que se necesitaban conseguir en los roedores sometidos a nuestro modelo de lesión cerebral. Los modelos animales constituyen un arma de trabajo ampliamente utilizado en la investigación de las secuelas motoras y sensoriales que se producen tras realizar un daño cerebral traumático experimental (Schwarzbach et al, 2006; Morganti-Kossmann et al, 2010), aunque existen muy pocos

estudios centrados en investigar como diferentes grados de déficit neurológico pueden afectar a la eficacia de los tratamientos experimentales.

Tsenter et al (2008) describen diferentes niveles de gravedad del trauma cerebral a través del uso del NSS test en un modelo de ratón, comenzando las valoraciones neurológicas 1 hora post-trauma. Así, definen una serie de categorías: el trauma leve corresponde con una valoración menor de 5; un trauma medio corresponde con una valoración de 5 a 6; un trauma grave puntúa de 7-8 y un trauma mortal corresponde a una puntuación de 9-10. Más recientemente, Schwarzbald et al (2010) utilizaron la misma clasificación para estudiar diferentes secuelas asociadas con el daño cerebral traumático; utilizaron un dispositivo de caída de pesos de diferente masa para inducir una lesión cerebral traumática en ratones. La valoración neurológica desarrollada 1h tras el trauma mostró que la gravedad de la lesión cerebral aumenta con el aumento del peso. En contra de lo obtenido en el presente estudio, donde los resultados muestran que la clasificación de los diferentes niveles de lesión cerebral crónica se consiguieron a través del uso del mismo modelo experimental, cuando éste se ve acompañado por un protocolo de cuidados post-operatorios muy estricto. La evolución del daño cerebral puede ser dependiente de la microestructura tisular y vascular que son únicas de cada animal, no siguiendo un patrón común en todos los animales y siendo dependiente del estado fisiológico de los mismos.

Otra característica que puede influir en la discrepancia de los resultados obtenidos de los diferentes modelos experimentales utilizados se relaciona con la variabilidad existente entre los diferentes laboratorios y la gran cantidad de modelos de lesión cerebral traumática empleados. En la mayoría de los trabajos planteados, los investigadores sólo se centran en estudiar los eventos que se suceden tras una lesión leve o media a las pocas horas, días o semanas tras el trauma, y en algunas circunstancias se han descrito resultados contradictorios utilizando el mismo planteamiento experimental (Jones et al, 2008; Pandey et al, 2009). Algo similar a los resultados que se han obtenido en el transcurso del presente estudio, donde la aplicación de un estricto protocolo de mantenimiento y vigilancia de los animales sometidos a un daño cerebral

traumático influye en la variabilidad de los niveles de lesión que permanecen en los mismos.

Posiblemente esta discrepancia asociada a los modelos experimentales de lesión traumática cerebral se debe a la dificultad que conlleva mantener animales con lesiones cerebrales a largo plazo. Como ya se ha mencionado, en el presente trabajo se desarrolló un protocolo de cuidados de los animales lesionados, intentando así aumentar al máximo la supervivencia y el número de animales con lesiones cerebrales graves. Dicho protocolo, se basa fundamentalmente en el cuidado intensivo de los animales dentro, al menos, de la primera semana post-traumatismo, donde son totalmente dependientes de los cuidados realizados por los investigadores. El no llevar a cabo dichos cuidados influye en que los animales con lesiones cerebrales graves mueran durante el transcurso de esa primera semana, tal y como sucedió en el desarrollo de la primera parte del estudio y como posiblemente sucede en el resto de trabajos experimentales publicados. Con ello, los animales que sobreviven muestran déficits similares, estandarizándose por sí solo el modelo de lesión cerebral utilizado.

Con nuestro modelo experimental, se detectaron déficits neurológicos evidentes a las pocas horas de producir la lesión cerebral traumática en todos los animales, momento en el cual se activa todo el protocolo de cuidados post-operatorios posibles para sacar adelante a los animales lesionados. Las semanas que siguieron al trauma se detectaron diferencias en la evolución de las secuelas entre los animales incluidos en el estudio, lo cual se representa en la diferente clasificación en el grado de lesión cerebral que obtuvieron al finalizar los dos meses de evolución del trauma.

En el presente trabajo, se estudió la evolución de los déficits neurológicos durante los dos meses siguientes a la realización del trauma cerebral. Se sabe que la lesión traumática produce sobre el cerebro la activación de procesos muy complejos como son la lesión primaria y la lesión secundaria. Dichos procesos son más severos en aquellos animales con lesiones cerebrales graves, y aunque conducen a la activación de mecanismos intrínsecos de

regeneración (Reilly 2001; Cernak 2005) son insuficientes para restaurar el tejido cerebral dañado, lo cual conlleva a obtener déficits permanentes en los animales lesionados. Posiblemente la diferente clasificación otorgada a cada individuo incluido en el estudio está relacionada con la evolución de la lesión secundaria. Se sabe, que la lesión secundaria contribuye en gran medida a establecer la discapacidad neurológica postraumática (DeKosky et al, 1998), pero en los modelos animales los mecanismos de lesión secundaria son difíciles de controlar, lo cual se traduce en la diferente clasificación neurológica de los animales dos meses tras la realización de la lesión.

## **2.2. VALORACIÓN FUNCIONAL**

Otra variable a tener en cuenta relacionada con la clasificación otorgada es la valoración neurológica. Para el desarrollo de este trabajo se ha utilizado una Escala de valoración sensitivo-motora, modificada a partir de escalas previamente descritas en la literatura (Chen et al, 2001b; Mahmood et al, 2001a) resultando finalmente en una escala de 19 puntos, y al uso de un sistema de análisis de imágenes de vídeo (VTB test), más objetivo, con el fin de valorar al máximo los aspectos relacionados con los déficits permanentes establecidos con el modelo de lesión cerebral utilizado. Durante la primera parte del estudio los animales fueron también valorados a través del Rotarod, que es un método clásico de medir lesiones cerebrales en roedores, pero cuyo uso en animales con lesiones cerebrales crónicas puede llevar a cometer algún tipo de error, ya que conlleva cierto grado de aprendizaje por parte de los animales.

La clasificación de los diferentes niveles de lesión cerebral descrita por Tsenter (2008) utiliza una escala de 10 puntos en un modelo de lesión cerebral en ratones, posiblemente utilizar pocos puntos de valoración dentro de la escala puede relacionarse con una menos definición del daño cerebral real de los animales. En este trabajo se utilizó una escala de valoración de 19 puntos, y posiblemente al incluir más aspectos dentro de los puntos de estudio se representa una mejor valoración de los déficits neurológicos adquiridos tras



realizar la lesión cerebral experimental. Finalmente se establecieron 3 niveles de déficit neurológico: lesión leve, lesión media y lesión grave.

Como ya se ha mencionado la clasificación final obtenida es diferente a las previamente descritas en la literatura, posiblemente porque utilizamos un método de valoración complejo, a través de la unión de los resultados obtenidos con la Escala de valoración sensitivo-motora de 19 puntos y del VTB test, para intentar valorar lo más fidedignamente posible las secuelas y la evolución de la lesión cerebral traumática en ratas. En el nivel de lesión leve descrito en el presente trabajo, los animales mostraron poco déficit neurológico y fueron retirados del estudio, ya que dichos animales son más susceptibles de sufrir una recuperación espontánea de su función neurológica que pudiera artefactar los resultados obtenidos; dicha recuperación es similar a la que ocurre durante la evolución de un TCE en pacientes, y además, es una característica observada en estudios de lesión cerebral en roedores (Flierl et al, 2009).

En el presente trabajo, los grupos de lesión media y grave sufrieron un criterio de selección que define su estado de déficit neurológico. En general, un animal que obtuvo la clasificación de lesión grave en cualquiera de los tests obtuvo la clasificación final de lesión grave, ya que obtener más puntuación en el desarrollo de cualquiera de los dos test está directamente relacionado con un daño cerebral mayor, algo similar a lo que ocurre en otros modelos de valoración del trauma cerebral experimental (Tsenter et al, 2008; Schwarzbald et al, 2010). Posiblemente los animales utilizados en la primera parte del estudio en realidad correspondían a animales con lesiones medias, ya que son aquellos que sobrevivieron a la lesión traumática cerebral sin haber sido incluidos en el protocolo de cuidados intensivos.

### 3. TERAPIA CELULAR Y LESIONES TRAUMÁTICAS CEREBRALES

Debido a la limitada capacidad de reparación del SNC tras sufrir un daño, se han desarrollado diferentes terapias celulares muy prometedoras para tratar el daño cerebral traumático. Las células madre embrionarias o el tejido fetal centraron la atención investigadora en el pasado como fuentes donantes dentro de las terapias reparadoras de órganos y tejidos dañados (García-Castro et al, 2008), pero su uso se ve limitado, ya sea por consideraciones éticas como por otros problemas científicos; además, es bien conocido el riesgo tumorigénico asociado al uso de células madre de origen embrionario (Riess et al, 2007). Por otro lado se sabe que el tejido adulto es una importante fuente de células madre; en concreto, la médula ósea representa una alternativa ya descrita décadas atrás para el aislamiento de CMM con el fin de desarrollar terapias celulares (Friedenstein et al, 1976). Son células de origen mesodérmico que residen en el estroma de la médula ósea y que además poseen la capacidad de diferenciarse hacia células de diversos fenotipos (Prockop, 1997; Kotobuki et al, 2004; Benayahu et al, 2007), incluyendo células de fenotipo neural (Dewaza et al, 2004; Zurita et al, 2007b, 2008a).

Las CMM son relativamente fáciles de aislar y pueden ser expandidas en cultivo para realizar trasplantes autólogos en pacientes. Dichas células han sido utilizadas en diferentes trabajos experimentales para tratar enfermedades y lesiones sobre el SNC (Chopp et al, 2002; Hofstetter et al, 2002; Ankeny et al, 2004; Zurita et al, 2008b; Li et al, 2009) y son consideradas actualmente como buenos candidatos en el desarrollo de protocolos de actuación para tratar las secuelas producidas como consecuencia de un TCE. Se sabe que la administración intravenosa e intralesional de CMM tiene efectos beneficiosos sobre la recuperación funcional en ratas que previamente habían sufrido un daño cerebral traumático, cuando la terapia se realiza durante la primera semana tras el trauma (Lu et al, 2001b; Mahmood et al, 2001a; Mahmood et al, 2002). Los resultados obtenidos de la primera parte del estudio demostraron que dicha terapia es igualmente beneficiosa cuando la administración se realiza

intralesionalmente en ratas con dos meses de evolución de la lesión cerebral, detectándose mejoras significativas en la recuperación funcional de los animales tratados con CMM (Bonilla et al, 2009b). Al igual que sucede en los estudios realizados en fase aguda, hemos verificado que, dos meses tras realizar el trasplante las CMM sobreviven y expresan marcadores típicos de células neuronales y gliales (Lu et al, 2001b; Mahmood et al, 2001a; Mahmood et al, 2002; Qu et al, 2008; Bonilla et al, 2009b). Aunque resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que la terapia intravenosa para tratar las secuelas crónicas traumáticas cerebrales no tiene efectos beneficiosos sobre la función neurológica de los animales tratados (Bonilla et al, 2011).

### **3.1. EFICACIA DE LA TERAPIA CELULAR EN LA LESIÓN TRAUMÁTICA CEREBRAL CRÓNICA**

#### **a) Mejoras sensoriales y motoras**

El modelo de lesión cerebral traumática experimental desarrollado en el presente trabajo causa pérdida de tejido cerebral y deficiencias motoras que son evidentes en todos los animales inmediatamente después de sufrir el trauma. Para tratar de medir los cambios funcionales, se ponen a punto una serie de test de valoración, donde podemos ver que la terapia con células madre tiene unos efectos beneficiosos dentro de los 2 meses en los que se sigue la evolución de los animales. El grupo experimental al que se le administró intralesionalmente suero no presentó mejoras motoras mientras que los animales a los que se les trasplantó intralesionalmente CMM de la médula ósea mostraron una evidente y progresiva recuperación en la función neurológica, comenzando a las pocas semanas después del tratamiento. Los resultados obtenidos sugieren la utilidad de este tipo de terapias con CMM para tratar las secuelas producidas como consecuencia de un TCE. Dichas observaciones se correlacionan con resultados descritos previamente por algunos autores en los que la administración de células madre adultas, del estroma de la médula ósea, en fases tempranas tras producirse un TCE, disminuyen los déficits funcionales tras una lesión traumática cerebral (Lu et al,

2001a, 2001b, 2006; Chopp et al, 2002; Mahmood et al, 2004b, 2007). Cabría ahora preguntarse, si este efecto es independiente del nivel de lesión crónico de los animales, estudio que se ha tratado de responder con el desarrollo de la segunda parte del presente trabajo de investigación.

## **b) Transdiferenciación de las CMM trasplantadas**

El hecho de que se puedan transdiferenciar las CMM del estroma de la médula ósea hacia un fenotipo neuronal abre numerosas posibilidades para el tratamiento de enfermedades y lesiones del SNC. En los últimos años se han multiplicado los estudios que demuestran cómo este proceso de transdiferenciación puede ser obtenido tanto en cultivo de tejidos, como en el seno del tejido nervioso, cuando las CMM adultas se implantan en zonas previamente lesionadas (Brazelton et al, 2000; Mezey et al, 2000). Como consecuencia de ello, cabe plantearse que a la hora de intentar una terapia celular para reparar lesiones neurológicas, no es necesario recurrir a procedimientos de manipulación de las CMM antes de su implante en el tejido nervioso, ya que el proceso de transdiferenciación neuronal que estas células experimentan debe estar relacionado con factores neurotróficos que influyen sobre su diferenciación, presentes en el propio tejido nervioso (Zurita et al, 2007a, 2007b).

Los resultados obtenidos en el modelo de trasplante de CMM para tratar las secuelas del TCE crónico desarrollado en este trabajo, muestra que existen diferencias entre los animales controles y las ratas trasplantadas con CMM a nivel de la zona de lesión. En aquellos animales que recibieron CMM la cavidad necrótica muestra algunos puentes tisulares en los cuales se localizaron células donantes positivas al gen Sry, y algunas de ellas co-expresando Neu-N o PGFA, lo cual supone que las células trasplantadas no sólo han sobrevivido dos meses desde su administración, sino que se han transdiferenciado después de ser trasplantadas dentro del cerebro. Resultados similares han sido descritos tras realizarse un trasplante con CMM en modelos de paraplejía experimental (Zurita et al, 2006), aunque hay estudios que sugieren que las

células trasplantadas podrían no ser responsables directamente de la recuperación funcional observada después del trasplante (Zhang et al, 2006).

### **c) Aumento de la neurogénesis y de la proliferación**

Las terapias con CMM pueden tener asociadas numerosas ventajas como son la activación de ciertos mecanismos en las células endógenas, aumentando su capacidad proliferativa y disminuyendo el espesor de la cicatriz glial a lo largo de la zona de lesión (Shen et al, 2007). Cuando células madre de la médula ósea son administradas en estados precoces después de un daño cerebral (Lu et al, 2001a, 2001b; Mahmood et al, 2003, 2007) o cuando son administradas localmente en modelos de paraplejia crónica (Zurita et al, 2006, 2008b), se comienza a observar una continua recuperación funcional desde momentos muy tempranos tras la realización de los tratamientos, algo similar a lo que se ha observado en el presente trabajo. Posiblemente la migración de las células hacia la lesión, su integración y diferenciación hacia elementos neurales, así como el establecimiento de conexiones funcionales con las propias células del tejido no se puede producir dentro de cortos periodos de tiempo, siendo más probable que estos efectos tempranos sobre la recuperación funcional estén mediados por otros mecanismos diferentes a la interacción de las CMM trasplantadas con el cerebro (Andres et al, 2008). Parece que existen diversos mecanismos que actúan sobre la recuperación funcional que se produce al realizar los trasplantes, donde se incluyen la expresión de factores neurotróficos o la activación de mecanismos endógenos capaces de restaurar las funciones neurológicas (Vaquero y Zurita, 2009).

Hoy día se sabe que la neurogénesis endógena puede ocurrir a lo largo de toda la vida en el SNC, debido a la existencia de células madre neurales (CMN) fundamentalmente a nivel de la ZSV (Lois y Álvarez-Buylla, 1993). Está ampliamente aceptado que las células progenitoras de la ZSV son capaces de responder a diferentes tipos de estímulos producidos como consecuencia de un trauma, aumentando su proliferación y migrando hacia las zonas dañadas (Romanko et al, 2004; Masuda et al, 2007). Existen estudios que sugieren que la administración intracerebral de CMM promueve la proliferación de la células

madre neurales endógenas de la ZSV (Yoo et al, 2008). En el presente trabajo, este aumento local de la neurogénesis está asociado con la presencia de rutas de migración desde la ZSV hacia la zona de lesión, donde se localiza la co-expresión de Nestina y Ki-67. Parece que dicho aumento de la neurogénesis endógena tras el trauma cerebral puede explicar la recuperación que sufren algunos pacientes las primera semanas tras haber sufrido el trauma, lo cual podría potenciarse a través de las terapias celulares intentando restaurar el daño cerebral y ofreciendo una nueva vía de investigación con la que estimular el aumento de la propia neurogénesis del cerebro a partir de tratamientos con células madre.

Con todo ello parece que las CMM cuando se administran 2 meses después de una lesión traumática grave, donde las secuelas neurológicas están establecidas, mejoran significativamente la recuperación funcional. Dentro de esta capacidad de las CMM de revertir los déficits crónicos asociados a una lesión traumática cerebral sería interesante comprobar si es independiente del nivel de lesión cerebral adquirido.

### **3.2. EFICACIA DE LA TERAPIA CELULAR EN RELACIÓN A DIFERENTES NIVELES DE LESIÓN CEREBRAL CRÓNICA**

La segunda parte del presente estudio fue planteada para intentar determinar si el grado de deterioro neurológico permanente asociado a una lesión cerebral traumática afecta o no en el porcentaje de recuperación tras la administración intralesional de CMM, y si dicho efecto tiene una representación morfológica sobre el tejido cerebral.

#### **a) Efecto de la Terapia celular sobre la recuperación funcional**

Prácticamente no existen evidencias experimentales del efecto de la terapia celular en animales con lesiones establecidas tras sufrir un daño traumático cerebral. En los escasos datos de los que se dispone no se han detectado diferencias significativas sobre la recuperación motora o cognitiva tras el tratamiento con neuronas NT2N trasplantadas estereotáxicamente en la zona

perilesional en un modelo de trauma cerebral crónico en ratas (Zhang et al, 2005), en contra de lo que sucede en el presente trabajo donde se logra revertir los déficits neurológicos tras el trasplante intralesional de CMM dos meses después de la realización de un trauma cerebral experimental (Bonilla et al, 2009b). Actualmente no hay publicado ningún trabajo en el que se estudie el potencial terapéutico de las CMM cuando estas son administradas en lesiones cerebrales medias o graves. En el presente estudio se ha llevado a cabo la administración tardía de CMM en diferentes niveles de lesión cerebral, dos meses tras realizar una lesión cerebral traumática en ratas.

El modelo de lesión traumática cerebral utilizado causa pérdida de tejido cerebral y déficits neurológicos los cuales son evidentes en todos los animales inmediatamente después del trauma, pero cuya evolución a largo plazo genera diferentes estados de déficit permanente. El tratamiento con CMM utilizado muestra diferentes resultados en la eficacia de la terapia celular dependiendo de la gravedad del daño cerebral permanente, dependiendo de si se trataba de una lesión media o grave. En el grupo de lesión grave, los animales que recibieron el tratamiento control con suero y los animales que recibieron el tratamiento con CMM mostraron una evolución neurológica similar, donde no se detectó ningún tipo de mejoría. En el grupo de lesión media, los animales que recibieron la administración intracerebral de CMM mostraron una recuperación progresiva y evidente de sus déficits neurológicos comparado con los animales de lesión media que recibieron el tratamiento control con suero salino, comenzándose a detectar las mejoras pocas semanas después del tratamiento. Resultados similares a los que se obtuvieron durante el transcurso de la primera parte del presente estudio, posiblemente porque como ya se ha mencionado, los animales utilizados para comprobar la utilidad de la terapia con CMM en las lesiones traumáticas cerebrales correspondían en realidad con animales con un nivel de lesión medio.

Los resultados obtenidos sugieren por primera vez que existe una relación entre el nivel de gravedad de la lesión cerebral y la efectividad de la terapia celular con CMM del estroma de médula ósea en el tratamiento de las secuelas permanentes tras sufrir un daño cerebral traumático. Posiblemente la diferencia

en la eficacia de la terapia celular dependiendo del nivel de déficit permanente esté relacionada con la propia fisiopatología de la lesión traumática cerebral. El estudio de la evolución de la lesión cerebral se realiza clásicamente mediante el empleo de modelos experimentales animales que intentan reproducir la lesión primaria y secundaria (Morales et al, 2005). En el presente estudio los niveles de lesión media y grave ofrecen diferentes perspectivas de recuperación tras el tratamiento con CMM, y posiblemente está relacionado con la evolución de la lesión secundaria. La lesión secundaria comienza tras sufrir un daño traumático cerebral y evoluciona los días, horas y pocas semanas tras el insulto inicial.

Otro aspecto clave a tener en cuenta es la valoración de la función neurológica de los animales (Fujimoto et al, 2004). Las diferencias detectadas en la valoración neurológica de los animales con lesión media y con lesión grave posiblemente están relacionadas con una lesión secundaria más acentuada en el grupo de lesión grave, lo cual podría limitar la eficacia de la terapia celular. La lesión secundaria comienza con el daño oxidativo, lo cual induce procesos inflamatorios y la activación de mecanismos de muerte celular secundaria por apoptosis (Chong et al, 2005; Darwish et al, 2007; Werner and Engelhard, 2007). Muchas cascadas fisiopatológicas diferentes pueden contribuir a la activación de la lesión secundaria tras el traumatismo cerebral (Xiong et al, 2009a). Los resultados obtenidos en este estudio contribuyen a conocer el potencial beneficioso del tratamiento con CMM en el tratamiento de las lesiones crónicas tras un daño cerebral, donde su eficacia está relacionada con el nivel de lesión cerebral permanente.

#### **b) Efecto de la terapia celular sobre el tejido cerebral**

En el estudio histológico desarrollado en el presente trabajo no se han detectado diferencias entre los grupos de lesión media y de lesión grave, ni entre los grupos que recibieron suero fisiológico o CMM, posiblemente porque las mejoras en la función neurológica obtenida tras la realización de los tratamientos en el grupo de lesión media implica más de un mecanismo.



En la primera parte del estudio realizado en nuestro laboratorio la co-identificación de las CMM junto con marcadores de células neuronales y gliales (Neu-N y GFAP) no sólo confirmó la supervivencia a largo plazo de las células trasplantadas sino también la transdiferenciación de las mismas (Bonilla et al, 2009b). Durante el desarrollo de la segunda parte del estudio se han obtenido resultados similares, es decir, se han detectados las CMM trasplantadas a través de la identificación del gen Sry del cromosoma Y en los animales que recibieron la terapia celular de los dos niveles de lesión estudiados. Además éste se expresaba conjuntamente con marcadores de células neuronales y gliales (Neu-N y PGFA respectivamente), aunque no se han detectado diferencias entre los grupos de lesión media y lesión grave. A pesar de ello, el bajo número de células detectadas en el trabajo anterior y el presente no puede por sí sólo ser el responsable de las mejoras funcionales observada tras el trasplante intralesional de CMM.

Las CMM son conocidas por segregar varios factores de crecimiento (Chen et al, 2002; Chopp et al, 2002; Yoshimura et al, 2003; Mahmood et al, 2004b), los cuales son también conocidos por promover la recuperación funcional tras un daño, así amplifican los niveles cerebrales endógenos. Como hemos visto, las CMM también inducen a las propias células del parénquima cerebral a producir esos factores tróficos (Mahmood et al, 2004b) e influyen sobre varias funciones reparadoras del propio tejido neural como son sinaptogénesis, angiogénesis (Qu et al, 2008) y neurogénesis (Chen et al, 2006; Bonilla et al, 2009b). Así parece obvio que existen diversos mecanismos de recuperación, los cuales pueden jugar un importante papel tras el trasplante, incluyendo mecanismos capaces de restaurar las funciones neurológicas previamente suprimidas (Vaquero y Zurita, 2009).

El aumento de la neurogénesis y la co-localización de las células trasplantadas junto con marcadores de células neurales, podrían explicar las mejoras funcionales obtenidas en el grupo de lesión media, pero en aquellos animales con lesiones cerebrales graves no sería suficiente para obtener mejoras funcionales a largo plazo. Aunque las conclusiones iniciales acerca de las propiedades terapéuticas de la terapia celular para tratar el TCE parecen

prometedoras, parece evidente que se precisa desarrollar estudios adicionales que confirmen los resultados obtenidos hasta la fecha.

Otro aspecto importante a considerar en el presente trabajo es que no se detectó una disminución del tamaño de la lesión, el trasplante de CMM por sí solo no afecta a la reducción de las cavidades cerebrales post-traumáticas. En una revisión recientemente publicada sobre las perspectivas actuales del trasplante de CMM de médula ósea para tratar lesiones del SNC apunta a que el tamaño de las lesiones cerebrales y la viabilidad celular son factores determinantes en la eficacia de las terapias celulares, y consideran la necesidad de encontrar un medio que favorezca la supervivencia y diferenciación de las células madre trasplantadas, añaden que podrían usarse matrices biológicas que potencien las cualidades beneficiosas de las células trasplantadas (Vaquero y Zurita, 2011). Otro aspecto importante que discuten los investigadores, está relacionado con el número crítico de CMM que es necesario trasplantar para ayudar realmente a restaurar los déficits funcionales asociados a un trauma cerebral. En 2005, Mahmood et al publicaron que existe una dosis dependencia entre el número de CMM trasplantadas y la recuperación funcional cuando los tratamientos se realizan por vía intravenosa una semana después de realizar un trauma cerebral en ratas. Sugieren que el número de células administrado es un factor determinante para lograr el efecto terapéutico deseado. En contra de estas conclusiones, Vaquero y Zurita (2011) consideran que aunque el número de células madre administrado es un factor importante no es determinante, puesto que creen que las investigaciones futuras en el campo de la terapia celular deben ir dirigidas hacia lograr aumentar la supervivencia e integración a largo plazo de las células trasplantadas en el tejido cerebral dañado. Junto con el número de células trasplantadas, el factor determinante en la eficacia de la terapia celular son los factores propios del tejido, la mayoría de los cuales están relacionados con la propia fisiopatología del daño traumático, y que a su vez están relacionados con la disminución en la supervivencia de las células trasplantadas.

## **4. NUEVAS PERSPECTIVAS EN EL TRATAMIENTO DE LAS LESIONES TRAUMÁTICAS CEREBRALES**

Como hemos visto parece evidente que las investigaciones desarrolladas acerca de la utilidad del trasplante de CMM muestran que dichas terapias son beneficiosas cuando las células se administran dentro de las primeras horas o días tras sufrir un daño cerebral o incluso cuando los tratamientos se desarrollan durante la fase crónica.

Una cuestión que parece evidente plantearse es que sucede cuando los tratamientos neuroprotectores y reparadores conocidos hasta la fecha se desarrollan de forma combinada, o cuando el efecto beneficioso de la terapia celular se combina con matrices de soporte que aumente las cualidades de las células trasplantadas.

### **4.1. TERAPIAS COMBINADAS**

Un punto importante a considerar es que sucedería si se combina el efecto de las terapias reparadoras a través de agentes farmacológicos descritos anteriormente con los nuevos hallazgos realizados en el área de la terapia celular.

En este campo, existen evidencias de que la combinación de estatinas con células madre adultas promueve la angiogénesis y neurogénesis; y unido al efecto de las células se observa un aumento de la vascularización del tejido dañado respecto de los controles (Mahmood et al, 2007; 2008). Estas terapias combinadas poseen propiedades neuroprotectoras y restaurativas superiores a las que se consiguen con el uso de una única monoterapia. Por otro lado también se ha investigado el efecto de la administración conjunta de CMM y factores de crecimiento (Bhang et al, 2007), donde parece que la actividad apoptótica en los animales trasplantados con CMM humanas y factor de crecimiento fibroblástico es la mitad que en el grupo de animales trasplantados únicamente con células. Uno de los problemas que se plantea en

prácticamente todos los estudios mencionados, es que aunque se encuentran células trasplantadas en la zona de lesión, y aunque éstas muestras fenotipos de elementos neurales aparecen en muy bajo número, por lo que no se detecta una reducción del volumen de lesión, posiblemente porque las células encuentran un ambiente poco favorable para poder sobrevivir y proliferar, y en mucha menor medida diferenciarse.

En todos estos trabajos las terapias se han desarrollado en fases tempranas tras producirse el daño, dónde el efecto protector de las CMM puede tener un mayor papel que el reparador, y esto puede haber contribuido a encontrar resultados menos satisfactorios de lo esperado.

#### **4.2. NUEVAS INVESTIGACIONES**

Aunque los resultados obtenidos con los trasplantes de las células madre adultas parecen estar dando sus frutos, donde parece que existe un efecto terapéutico beneficioso de las CMM procedentes de la médula ósea para tratar las secuelas de TCE (Xiong et al, 2009b), y aunque cada vez parece más claro que tal vez el futuro esté en desarrollar terapias combinadas (Chen et al, 2006; Zhang et al, 2009), aún queda una cuestión importante por resolver, en la que parece que aún no se han centrado los investigadores. Tanto con la administración intravenosa como con la administración intracerebral se encuentran células marcadas en los bordes de la lesión (Lu et al, 2001a; Mahmood et al, 2002, 2003; Chopp et al, 2002; Qu et al, 2008; Bonilla et al, 2009b; Harting et al, 2009; Li et al, 2009) quedando un gran vacío en el que ni los factores de crecimiento ni las propias células pueden actuar, es decir no se detectan cambios en el volumen de lesión y el número de células trasplantadas que se diferencian a elementos neurales es muy bajo.

Si se pudiese aumentar la supervivencia e integración de las células trasplantadas en el tejido cerebral dañado posiblemente se favorecería la disminución de las cavidades post-traumáticas, lo cual favorecería en mayor medida la recuperación de la función neurológica independientemente de la gravedad de la lesión, potenciándose al máximo la efectividad de la terapia

celular. En esta nueva línea de investigación es donde se están centrando los nuevos estudios, ya que se trata de encontrar un nuevo mecanismo para realizar la terapia celular donde se aumente la viabilidad de las células sin aumentar por ello el número de células trasplantadas, y donde a su vez se potencie al máximo las cualidades que pueda aportar esta nueva forma de terapia.

Diferentes estudios han demostrado que una matriz extracelular organizada podría ser necesaria para lograr la adhesión, diferenciación y proliferación celular. En las estrategias de terapia celular para reparar lesiones en el SNC, las células a trasplantar generalmente se inyectan en un tejido lesionado en el que la vascularización es baja y donde aparece una respuesta inflamatoria. En estas circunstancias adversas, las células trasplantadas pueden morir por un proceso de apoptosis desencadenado por la pérdida de contacto intercelular, al que se conoce como «anoikis». Por esta razón, se ha planteado la necesidad de obtener una matriz de soporte que permita un entorno permisivo para la supervivencia, la proliferación y la diferenciación celular (Tabata 2008).

Entre las diversas matrices biológicas que se han considerado útiles como soporte celular está el gel de fibrina, ya que la malla que forma la proteína es lo suficientemente porosa para permitir la migración de las células y el contacto entre ellas (Laurens et al, 2006). El gel de fibrina se basa en la polimerización de fibrinógeno y trombina con calcio para formar una red de fibrina que imita los pasos finales de la coagulación de la sangre. Actualmente existen preparados comerciales, homologados para uso clínico como sellantes biológicos, y experimentalmente, diversos estudios han señalado que el gel de fibrina puede ser útil como soporte celular. Se ha descrito, además, que las matrices diseñadas con fibrina pueden aumentar la adhesión y la proliferación celular en presencia de factores tróficos (Ruszymah 2004; Schmoekel et al, 2005), por lo que han sido utilizadas como soporte de células madre embrionarias (Willerth et al, 2006), fibroblastos (Cox et al, 2004) o células madre estromales (Yamada et al, 2003).

En los estudios realizados en nuestro laboratorio, se han obtenido evidencias de que la administración intracerebral de CMM del estroma de médula ósea es capaz de recuperar parcialmente los déficits funcionales que tienen lugar tras un TCE importante en ratas adultas. En estos estudios, la administración de las CMM parece ir seguida de la incorporación de estas células al tejido huésped, con signos de diferenciación neural, y de un aumento de la neurogénesis endógena (Bonilla et al, 2009b). A pesar de ello, se admite que existe una importante pérdida de CMM tras el trasplante, ya que éstas son colocadas en una zona donde hay una cavidad necrótica postraumática y donde es difícil lograr un efectivo contacto intercelular. Siguiendo con esta línea de investigación, están apareciendo publicaciones que buscan terapias restauradoras y reparadoras, centradas en encontrar una matriz que potencie la viabilidad y supervivencia de las células trasplantadas. Ya en 2007, apareció un trabajo donde se realizó el trasplante intralesional de una matriz de colágeno junto con CMM pocos días después de haber realizado una lesión cerebral traumática experimental, concluyendo que esta nueva terapia ayuda a mejorar la memoria espacial y la función sensori-motora de los animales, por otro lado también favorece la reducción del volumen de lesión y la migración de las células trasplantadas hacia el tejido cerebral cuando se compara con los resultados obtenidos con la administración sin matriz de colágeno de CMM (Lu et al, 2007b). Continuando con estas conclusiones iniciales otros trabajos experimentales han seguido desarrollando esta nueva línea (Bhang et al, 2007, Qu et al, 2009, Xiong et al, 2009b). En todos los trabajos publicados hasta la fecha se han encontrado evidencias a favor del uso combinado de la terapia celular junto con una matriz de soporte, al menos cuando la terapia se realiza durante la fase aguda tras el trauma cerebral.

Con la hipótesis de que la administración de CMM sobre una matriz biológica de fibrina podría mejorar las condiciones de contacto intercelular y aumentar la eficacia de la terapia desarrollamos un estudio experimental utilizando como soporte una matriz comercial (Bonilla et al, 2009c). En dicho estudio no hemos podido demostrar que el trasplante de CMM sobre una matriz de fibrina comercial aumente los buenos resultados que se obtienen tras la administración de CMM suspendidas en suero fisiológico. Consecuentemente,

se hacen necesarios estudios in vitro con el objetivo de valorar la supervivencia, proliferación y diferenciación neural de las CMM estromales de médula ósea.

La búsqueda de un soporte útil que aumente la supervivencia e integración de las células en el tejido cerebral dañado, es una de las posibilidades a investigar y que pueden permitir la obtención de matrices biológicas útiles para optimizar los resultados de la terapia celular aplicada a lesiones traumáticas cerebrales. Continuando con los resultados obtenidos hasta la fecha, se intenta encontrar una matriz donde las células sobrevivan y se mejore su capacidad de integración en el tejido cerebral crónico, donde las condiciones son muy inapropiadas. Recientes resultados obtenidos en nuestro laboratorio apuntan a que se puede obtener una matriz derivada de plasma sanguíneo como nuevo método de soporte en terapia celular (Zurita et al, 2010), abriendo nuevas perspectivas dentro de este área de investigación.

Sin embargo, aunque parece que todavía queda mucho por hacer dentro del campo de la terapia celular, ya existen estudios clínicos acerca de la seguridad y viabilidad del tratamiento autólogo con CMM para tratar las secuelas del daño cerebral traumático (Zhang et al, 2008; Cox et al, 2011). Donde no se ha detectado ninguna clase de rechazo o toxicidad inmediata o tardía asociado al tratamiento dentro del tiempo en el que se desarrollaron dichos estudios, aportándose además evidencias a favor de mejoras en la función neurológica en ambos estudios.

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación se amplían los conocimientos que tenemos acerca de la eficacia y utilidad de la terapia celular para tratar las lesiones cerebrales crónicas, y aunque la aplicación de estas técnicas en pacientes está comenzando, parece obvio que aún no tenemos el conocimiento necesario acerca de la fisiopatología del TCE y como la terapia celular puede actuar y cómo podemos optimizar los buenos resultados obtenidos hasta la fecha.

# CONCLUSIONES

---



## CONCLUSIONES

---

Con el desarrollo del presente trabajo de investigación se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Es posible desarrollar un modelo experimental de lesión cerebral traumática crónica en ratas Wistar adultas, que produce secuelas neurológicas de diferentes gravedad que son medibles y cuantificables.
2. Se puede realizar sin efectos secundarios el trasplante intralesional de CMM obtenidas de la médula ósea para tratar las secuelas crónicamente establecidas producidas como consecuencia de un daño cerebral grave.
3. Tras el trasplante de CMM se objetiva una mejora continua y significativa en la función motora y sensorial de los animales con lesión cerebral crónica, aunque dicha mejora es dependiente del nivel de lesión cerebral.
4. Las células trasplantadas sobreviven (positivas al gen Sry) y expresan marcadores neuronales y gliales (Neu-N o PGFA, respectivamente), independientemente del nivel de lesión cerebral permanente.
5. En los diferentes niveles de lesión cerebral crónica se observa, tras el trasplante de CMM, un aumento en la proliferación (células Ki-67<sup>+</sup>) y en la neurogénesis (Nestina<sup>+</sup>) respecto de los controles.
6. Como principal conclusión, de posible aplicación traslacional, destacamos, por tanto, la eficacia terapéutica de la administración intralesional de CMM en las lesiones moderadas crónicas producidas como consecuencia de un daño cerebral traumático.

# BIBLIOGRAFÍA

---

## BIBLIOGRAFÍA

---

### A

---

Allen AR. Surgery of experimental lesión of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. JAMA 1911; 57:878-880.

Andres RH, Guzman R, Ducray AD, Mordasini P, Gera A, Barth A, Widmer HR, Steinberg GK. Cell replacement therapy for intracerebral hemorrhage. Neurosurgical Focus 2008; 24(3&4), E15.

Álvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. Nature 2003 ; 425:968-973.

Ankeny DP, Mc Tigue DM, Jakeman LB. Bone marrow transplants provide tissue protection and directional guidance for axons after contusive spinal cord injury in rats. Exp Neurol 2004; 190:17-31.

### B

---

Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neuroscience: exploring the brain. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

Beauchamp K, Mutlak H, Smith WR, Shohami E, Stahel PF. Pharmacology of traumatic brain injury:where is the “golden bullet”? Mol Med 2008; 14:731–740.

Benayahu D, Akavia UD, Shur I. Differentiation of bone marrow stroma-derived mesenchymal cells. Curr Med Chem 2007; 14:173-179.

Bhang SH, Lee YE, Cho SW, Shim JW, Lee SH, Choi CY, Chang JW, Kim BS. Basic fibroblast growth factor promotes bone marrow stromal cell transplantation-mediated

neural regeneration in traumatic brain injury. *Biochemical Biophysics Research Commun* 2007; 359:40-45.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal cells: nature, biology and potencial applications. *Stem Cells* 2001; 19:180-192.

Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *PNAS USA* 2002; 99:2344-2349.

Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Rodríguez A, Zurita M, Vaquero J. Estudio de la utilidad del gel de fibrina como soporte celular en el trasplante intracerebral de células madre mesenquimales. *Trauma Fund Mapfre* 2009c; 20:243-248.

Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Rodríguez A, Zurita M, Vaquero J. Terapia celular para el tratamiento del daño cerebral traumático: Utilidad de diferentes escalas de valoración funcional. *Trauma Fund Mapfre* 2009a; 20: 234-242.

Bonilla C, Zurita M, Otero L, Aguayo C, Rico MA, Rodríguez A, Vaquero J. Failure of delayed intravenous administration of bone marrow stromal cells after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2011 Oct 14. In press.

Bonilla C, Zurita M, Otero L, Aguayo C, Vaquero J. Delayed intralesional transplantation of bone marrow stromal cells increases endogenous neurogenesis and promotes functional recovery after severe traumatic brain injury. *Brain Inj* 2009b; 23:760-769.

Bossolasco P, Cova L, Calzarossa C, Rimoldi SG, Borsotti C, Delilieri GL et al. Neuroglial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. *Exp Neurol* 2005; 193:312-325.

Brazelton TR, Rossi Fabio MV, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*. 2000;290:1775-1779.

Bruns J Jr, Hauser WA. The Epidemiology of Traumatic Brain Injury: a Review. *Epilepsia* 2003; 44:2-10.

Bullock R, Chesnut RM, Clifton G, Ghajar J, Marion DW, Narayan RK, Newell DW, Pitts LH, Rosner MJ, Wilberger JW. Guidelines for the management of severe head injury. Brain Trauma Foundation. Eur J Emerg Med 1996; 3:109-27.

---

## C

---

Cernak I. Animal Models of Head Injury. NeuroRx 2005; 2: 410-422.

Chen J, Chopp M. Neurorestorative treatment of stroke: cell and pharmacological approaches. NeuroRx 2006; 3:466–473.

Chen J, Li Y, Wang L, Lu M, Zhang X, Chopp M. Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. J Neurol Sci 2001a; 189:49-57.

Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang Lei, Lu Mei, Willing AE, Sanchez-Ramos J, Chopp M. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. Stroke 2001b; 32:2682-2688.

Chen X, Katakowski M, Li Y, Lu D, Wang L, Zhang L, Chen J, Xu Y, Gautam S, Mahmood A, Chopp M. Human bone marrow stromal cell cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factor production. J Neurosci Res 2002; 69:687–691.

Chong ZZ, Li F, Maiese K. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease. Prog Neurobiol 2005; 75, 207–246.

Chopp M, Li Y. Treatment of neural injury with marrow stromal cells. Lancet Neurol 2002; 1: 92–100.

Cox CS Jr, Baumgartner JE, Harting MT, Worth LL, Walker PA, Shah SK, Ewing-Cobbs L, Hasan KM, Day MC, Lee D, Jimenez F, Gee A. Autologous bone marrow mononuclear cell therapy for severe traumatic brain injury in children. Neurosurgery 2011; 68(3):588-600.

Cox S, Cole M, Tawil B. Behavior of human dermal fibroblasts in three dimensional fibrin clots: dependence on fibrinogen and thrombin concentration. *Tissue Eng* 2004; 10:942-954.

## D

---

Darwish RS, Amiridze N, Aarabi B. Nitrotyrosine as an oxidative stress marker: evidence for involvement in neurologic outcome in human traumatic brain injury. *J Trauma* 2007; 63, 439–442.

DeKosky ST, Kochanek PM, Clark RS, Ciallella JR, Dixon CE. Secondary injury after head trauma: subacute and long-term mechanisms. *Semin Clin Neuropsychiatry* 1998; 3:176 –185.

Dewaza M, Kanno H, Hoshino M, Cho H, Matsumoto N, Itokazu Y et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J clin Invest* 2004;113 :1701-1710.

Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods* 1991; 39: 253-262.

Dixon CE, Flinn P, Bao J, Venya R, Hayes RL. Nerve growth factor attenuates cholinergic deficits following traumatic brain injury in rats. *Exp Neurol* 1997; 146 :479-490.

Dixon CE, Lyeth BG, Povlishock JT, Findling RL, Hamm RJ, Marmarou A, Young HF, Hayes RL. A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurosurg* 1987; 67:110-119

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315-317.

Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 2001; 414:92-97.

Doppenberg EM, Choi SC, Bullock R. Clinical trials in traumatic brain injury: lessons for the future. *J Neurosurg Anesthesiol* 2004; 16:87–94.

Dunham NW, Miya TS. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc* 1957; 46(3):208-9.

---

## E

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292:154-156.

---

## F

Faden AI. Neuroprotection and traumatic brain injury: theoretical option or realistic proposition. *Curr Opin Neurol* 2002; 15:707-712.

Finnie JW, Blumbergs PC. Traumatic brain injury. *Vet Pathol* 2002; 39:679-689.

Flierl MA, Stahel PF, Beauchamp KM, Morgan SJ, Smith WR, Shohami E. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nat Protoc* 2009; 4:1328–1337.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental Hematology* 1976; 4:267-274.

Fujimoto ST, Longhi L, Saatman KE, Conte V, Stocchetti N, McIntosh TK. Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury. *Neurosci Biobehav Rev* 2004; 28:365-378.

---

## G

Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; 287:1433-1438.

Gao J, Prough DS, McAdoo DJ, Grady JJ, Parsley MO, Ma L, Tarenko YI, Wu P. Transplantation of primed human fetal neural stem cells improves cognitive function in rats after traumatic brain injury. *Experimental Neurology* 2006; 201:281-292.

García-Castro J, Rubio D, Bernard A. Biosafety issues in human cell therapy. In: *Cell Therapy*. Garcia-Olmo D, García-Verdugo JM, Alemany J, Gutiérrez-Fuentes JA (Eds). Madrid: McGraw-Hill; 2008, pp. 58–69.

Gennarelli TA. Animate models of human head injury. *J Neurotrauma* 1994; 11:357-368.

Guan J, Miller OT, Waugh KM, McCarthy DC, Gluckman PD. Insulin-like growth factor-1 improves somatosensory function and reduces the extent of cortical infarction and ongoing neuronal loss after hypoxia-ischemia in rats. *Neuroscience* 2001;105:299-306.

---

## H

---

Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW.), The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1994; 11(2):187-96.

Harting MT, Baumgartner JM, Worth LL, Ewing-Cobbs L, Gee AP, Day MC, Cox CS. Cell therapies for traumatic brain injury. *Neurosurg Focus* 2008a; 24(3-4):E18.

Harting MT, Jimenez F, Pati S, Baumgartner J, Cox CS. Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2008b; 10:243-253.

Harting MT, Jimenez F, Xue H, Fischer UM, Baumgartner J, Dash PK, Cox CS. Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2009; 110(6):1189-97.

Hawthorne G, Gruen RL, Kaye AH. Traumatic brain injury and long-term quality of life: findings from an Australian study. *J Neurotrauma* 2009; 26:1623–1633.



Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 2004; 117:4411-4422.

Ho AD, Wagner W, Franke W. Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations. *Cytotherapy* 2008; 10:320-330.

Hofstetter C P, Schwartz E J, Hess D, Widnalk J, El Manira A, Prockop Dj, Olson L. Marrow stromal cells from guiding strans in the injured spinal cord and promote recovery *PNAS USA* 2002; 99:2199-2204.

Houchens DP. Therapy of human tumors in athymic (nude) mice. *Proceeding of the Symposium on the use of athymic nude mice in cancer research*. PP 266-280 Ed. Gustav Fischer. New York, 1978.

Hudak AM, Caesar RR, Frol AB, Krueger K, Harper CR, Temkin NR, Dikmen SS, Carlile M, Madden C, Diaz- Arrastia R. Functional Outcome Scales in Traumatic Brain Injury: A Comparison of the Glasgow Outcome Scale (Extended) and the Functional Status Examination. *J Neurotrauma* 2005; 22:1319-1326.

Hung S, Cheng H, Pan C, Tsai MJ, Kao L, Ma H. In vitro differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells. *Stem Cells* 2002; 20:522-529.

---

## I

---

## J

---

Jain KK. Neuroprotection in traumatic brain injury. *Drug Discov. Today* 2008; 13 (23-24): 1082–1089.

Jennett B, Bond M. Assessment of outcome after severe brain damage. *Lancet* 1975; 1:480-484.

Jones NC, Cardamone L, Williams JP, Salzberg MR, Myers D, and O'Brien TJ. Experimental traumatic brain injury induces a pervasive hyperanxious phenotype in rats. *J. Neurotrauma* 2008; 25:1367–1374.

## K

---

Kang SK, Lee DH, Bae YC, Kim HK, Baik SY, Jung JS. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp Neurol* 2003; 183:355–366.

Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, Ohgushi H. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artif Organs* 2004; 28:33-39.

## L

---

Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J Head Trauma Rehabil* 2006; 21:375–378.

Laurens N, Koolwijk P, De Maat MP. Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost* 2006; 4:932-939.

Laurer HL, McIntosh TK. Experimental models of brain trauma. *Curr Opin Neurol* 1999; 12: 715–721.

Lee J, Kuroda S, Shichinohe H, Ikeda J, Seki T, Hida K, et al. Migration and differentiation of nuclear fluorescence-labeled bone marrow stromal cells after transplantation into cerebral infarct and spinal cord injury mice. *Neuropathol* 2003; 23:169-180.

Lee TH, Yoon JG. Intracerebral transplantation of human adipose tissue stromal cells after middle cerebral artery occlusion in rats. *J Clin Neuros* 2008; 15: 907–912.

Leker RR, Shohami E, Constantini S. Experimental models of Head Trauma. *Acta Neurochir*, 2002; 83:49-54.

Li Y, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury. *Neurosci Lett*. 2009; 456(3):120-123.

Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1993;90:2074-207.

Longhi L, Watson DJ, Saatman KE, Thompson HJ, Zhang C, Fujimoto S, Royo N, Castelbuono D, Raghupathi R, Trojanowski JQ, Lee VM, Wolfe JH, Stocchetti N, McIntosh TK. Ex vivo gene therapy using targeted engraftment of NGF-expressing human NT2N neurons attenuates cognitive deficits following traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* 2004; 21:1723-1736.

Lovell-Badge R. The future for stem cell research. *Nature* 2001; 414:88-91.

Lu D, Li Y, Mahmood A, Wang L, Rafiq T, Chopp M. Neural and marrow—derived stromal cell sphere transplantation in a rat model of traumatic brain injury *J Neurosurg*. 2002; 97(4):935-940.

Lu D, Li Y, Wang L, Chen J, Mahmood A, Chopp M. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2001a; 18:813-819.

Lu D, Mahmood A, Chopp M. Biological transplantation and neurotrophic induced neuroplasticity after traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil* 2003; 18:357-376.

Lu D, Mahmood A, Qu C, Goussev A, Lu M, Chopp M. Atorvastatin reduction of intracranial hematoma volume in rats subjected to controlled cortical impact. *J Neurosurg* 2004; 101:822-825.

Lu D, Mahmood A, Qu C, Goussev A, Schallert T, Chopp M. Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2005; 22:1011-1017.

Lu D, Mahmood A, Qu C, Hong X, Kaplan D, Chopp M. Collagen scaffolds populated with human marrow stromal cells reduce lesion volume and improve functional outcome after traumatic brain injury. *Neurosurgery* 2007b; 61:596–602.

Lu D, Mahmood A, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport* 2001b; 12(5):559-563.

Lu D, Qu C, Goussev A, Jiang H, Lu C, Schallert T, Mahmood A, Chen J, Li Y, Chopp M. Statins increase neurogenesis in the dentate gyrus, reduce delayed neuronal death in the hippocampal CA3 region, and improve spatial learning in rat after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007a; 24:1132-1146.

Lu J, Mochala S, Moore XL, Ng KC, Tan MH, Lee LK, He B, Wong MC, Ling EA. Adult bone marrow cells differentiate into neural phenotypes and improve functional recovery in rats following traumatic brain injury. *Neurosci Letters* 2006; 398:12-17.

---

## M

---

Machado AG, Shoji A, Ballester G, Marino R Jr. Mapping of the rat's motor area after hemispherectomy: The hemispheres as potentially independent motor brains. *Epilepsia* 2003; 44(4):500-506.

Mahmood A, Goussev A, Lu D, Qu C, Xiong Y, Kazmi H, Chopp M. Long-lasting benefits after treatment of traumatic brain injury (TBI) in rats with combination therapy of marrow stromal cells (MSCs) and simvastatin. *J Neurotrauma*. 2008; 25(12):1441-7.

Mahmood A, Lu D, Chopp M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2004b; 21:33-39.

Mahmood A, Lu D, Chopp M. Marrow stromal cell transplantation after traumatic brain injury promotes cellular proliferation within the brain. *Neurosurg* 2004a; 55(5):1185-1193.

Mahmood A, Lu D, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurg* 2003; 53:697-702.

Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Chopp M. Human marrow stromal cell treatment provides long-lasting benefit after traumatic brain injury in rats. *Neurosurgery* 2005; 57(5):1026-31; discussion 1026-1031.

Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Chopp M. Long-term recovery after bone marrow stromal cell treatment of traumatic brain injury in rats. *J Neurosurg.* 2006; 104(2):272-277.

Mahmood A, Lu D, Qu C, Goussev A, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury with a combination therapy of marrow stromal cells and atorvastatin in rats. *Neurosurg* 2007; 60(3):546-53; discussion 553.

Mahmood A, Lu D, Wang L, Chopp M. Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2002; 19:1609-1617.

Mahmood A, Lu D, Wang L, Li Y, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells. *Neurosurg* 2001a; 49:1196-1203; discussion 1203-1204.

Mahmood A, Lu D, Yi L, Chen JL, Chopp M. Intracranial bone marrow transplantation after traumatic brain injury improving functional outcome in adult rats. *J Neurosurg.* 2001b; 94(4):589-595.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *PNAS USA* 1981; 78:7634-7638.

Masuda T, Isobe Y, Aihara N, Furuyama F, Misumi S, Kim T, Nishino H, Hida H. Increase in neurogenesis and neuroblast migration after a small intracerebral hemorrhage in rats. *Neuroscience Letters* 2007;425:114-119.

McKay R. Stem cells--hype and hope. *Nature* 2000; 406:361-364.

Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, Mckercher SR. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science.* 2000; 290: 1779-1782.

Mezey E, Chandross KJ. Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system. *Eur J Pharmacol* 2000; 405:297-302.

Morales C, Zurita M, Vaquero J. Antitumoral effect of irinotecan (CPT-11) on an experimental model of malignant neuroectodermal tumor. *J Neuro-Oncol* 2002; 56:219-226.

Morales DM, Marklund N, Lebold D, Thompson HJ, Pitkanen A, Maxwell WL, Longhi L, Laurer H, Maegele M, Neugebauer E, Graham DI, Stocchetti N, McIntosh TK. Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience* 2005; 136:971–989.

Morganti-Kossmann MC, Yan E, Bye N. Animal models of traumatic brain injury: is there an optimal model to reproduce human brain injury in the laboratory? *Injury* 2010; 41(1):S10-S13.

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982; 297:681-3.

## N

---

Narayan RK, Michel ME, Ansell B, Baethmann A, Biegon A, Bracken MB, et al. Clinical trials in head injury. *J Neurotrauma* 2002; 19:503–57.

## O

---

Olsson M., Bentlage C., Victorin K., Campbell K., and Bjorklund A. Extensive migration and target innervation by striatal precursors after grafting into the neonatal striatum. *Neuroscience* 1997; 79:57-78.

Otero L, Zurita M, Aguayo C, Bonilla C, Rodríguez A, Vaquero J. Video-Tracking-Box linked to Smart software as a tool for evaluation of locomotor activity and orientation in brain-injured rats. *J Neurosci Methods* 2010; 188:53-7.

**P**

---

Pandey DK, Yadav SK, Mahesh R, Rajkumar R. Depression-like and anxiety-like behavioural aftermaths of impact accelerated traumatic brain injury in rats: a model of comorbid depression and anxiety? *Behav Brain Res* 2009; 205:436–442.

Parr AM, Tator CH, Keating A. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40:609-619.

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, New York, 1998.

Prieto R, Gutierrez-Gonzalez R, Pascual JM, Roda JM, Cerdan S, Matias-Guiu J, Barcia JA. Modelos experimentales de traumatismo craneoencefálico. *Neurocirugia* 2009; 20:225-244.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissue. *Science* 1997; 276:71-74.

**Q**

---

Qu C, Lu D, Goussev A, Schallert T, Mahmood A, Chopp M. Effect of atorvastatin on spatial memory, neuronal survival, and vascular density in female rats after traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2005; 103:695-701.

Qu C, Mahmood A, Lu D, Goussev A, Xiong Y, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in mice with marrow stromal cells. *Brain Res* 2008; 1208:234-9.

Qu C, Xiong Y, Mahmood A, Kaplan DL, Goussev A, Ning R, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in mice with bone marrow stromal cell-impregnated collagen scaffolds. *J Neurosurg.* 2009; 111(4):658-65.

## R

---

Reilly PL. Brain injury: the pathophysiology of the first hours. "Talk and Die revisited." J Clin Neurosci 2001; 8:398-403.

Riess P, Molcanyi M, bentz K, maegele M, Simanski C, Carlitscheck C, Scheider A, Hescheler J, Bouillon B, Schafer U, Neugebauer E. Embryonic stem cell transplantation after experimental traumatic brain injury dramatically improves neurological outcome, but may cause tumors. J Neurotrauma 2007; 24(1):216-25.

Romanko MJ, Rola R, Fike JR, Szele FG, Dizon ML, Felling RJ, Brazel CY, Levinson SW. Roles of the mammalian subventricular zone in cell replacement after brain injury. Progress in Neurobiology 2004;74:77-99.

Royo NC, Shimizu S, Schouten JW, Stover JF, McIntosh TK. Pharmacology of traumatic brain injury. Curr Opin Pharmacol 2003; 3:27–32.

Ruszymah BH. Autologous human fibrin as the biomaterial for tissue engineering. Med J Malaysia 2004; 59(suppl B):30-31.

## S

---

Saatman KE, Contreras PC, Smith DH, Raghupathi R, McDermott KL, Fernandez SC, Sanderson KL, Voddi M, McIntosh TK. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) improves both neurological motor and cognitive outcome following experimental brain injury. Exp Neurol 1997; 147:418-427.

Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. Biochem Biophys Res Commun 1998; 253:26-32.

Sánchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Stedeford T, Willing A, Freemant B, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper D R, Sanberg P R. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. Experimental Neurology 2000; 164:247-256.



Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 2006; 441:1075-1079.

Schmoekel HG, Weber FE, Schense JC, Grätz KW, Schawalder P, Hubbell JA. Bone repair with a form of BMP-2 engineered for incorporation into fibrin cell ingrowth matrices. *Biotechnol Bioeng* 2005; 89:253-262.

Schwarzbach E, Bonislawski DP, Xiong G, Cohen AS. Mechanisms underlying the inability to induce area CA1 LTP in the mouse after traumatic brain injury. *Hippocampus* 2006; 16:541–550.

Schwarzbold ML, Rial D, De Bem T, Machado DG, Cunha MP, dos Santos AA, dos Santos DB, Figueiredo CP, Farina M, Goldfeder EM, Rodrigues ALS, Prediger RDS, Walz R. Effects of traumatic brain injury of different severities on emotional, cognitive, and oxidative stress-related parameters in mice. *J Neurotrauma* 2010; 27:1883–1893.

Shen LH, Li Y, Chen J, Zacharek A, Gao Q, Kapke A, Lu M, Raginski K, Vaguri P, Smith A, Chopp M. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007; 27(1):6-13.

Smith K. Drug can clear away one fearful memory while leaving another intact. *Nature*, 2007.

Shohami E, Novikov M, Bass R. Long-term effect of HU-211, a novel non-competitive NMDA antagonist, on motor and memory functions after closed head injury in the rat. *Brain Res* 1995; 674:55-62.

Smith DH, Okiyama K, Thomas MJ, Claussen B, McIntosh TK. Evaluation of memory dysfunction following experimental brain injury using the Morris water maze. *J Neurotrauma* 1991; 8:259–269.

---

## T

Tabata Y. Important contribution and necessity of stem cells scaffolds for regenerative medicine and therapeutic applications. *Nippon Rinsho* 2008; 66:881-886.

Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien)* 2006; 148:255–68.

Tárnok A, Ulrich H, Bocsi J. Phenotypes of Stem Cells from Diverse Origin. *Cytometry* 2010; 77A:6-10.

Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 1974; 2:81-84.

Temple S. The development of neural stem cells. *Nature* 2001; 414:112-117.

Thompson HJ, LeBold DG, Marklund N, Morales DM, Hagner AP, McIntosh TK. Cognitive evaluation of traumatically brain-injured rats using serial testing in the Morris water maze. *Restor Neurol Neurosci* 2006; 24:109-114.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-1147.

Thurman D, Guerrero J. Trends in hospitalization associated with traumatic brain injury. *JAMA* 1999; 282:954–957.

Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res* 2004; 295:395-406.

Tsenter J, Beni-Adani L, Assaf Y, Alexandrovich AG, Trembovler V, Shohami E. Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities, and motor and cognitive functions. *J Neurotrauma* 2008; 25:324–333.

---

## U

---

## V

Vaquero J. *Patología Quirúrgica del Sistema Nervioso*. Editorial Universitaria Ramón Areces, Madrid, 2006.

Vaquero J, Rodriguez-Boto G. Daño cerebral postraumático. Ed Mapfre SA 2007.

Vaquero J, Zurita M, Oya S, Santos M. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration? *Neurosc Lett* 2006; 398:129-134.

Vaquero J, Zurita M. Functional recovery after severe CNS trauma: Current perspectives for cell therapy with bone marrow stromal cells. *Prog Neurobiol* 2011; 93(3):341-9.

Vaquero J, Zurita M. Bone marrow stromal cells for spinal cord repair: A challenge for contemporary neurobiology. *Histol Histopathol* 2009; 24:107–116.

Vink R, Nimmo AJ. Novel therapies in development for the treatment of traumatic brain injury. *Expert OpinInvestig Drugs* 2002; 11:1375-1386.

## **W**

---

Wang KK, Larner SF, Robinson G, Hayes RL. Neuroprotection targets after traumatic brain injury. *Curr Opin Neurol* 2006; 19:514–519.

Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth* 2007; 99:4–9.

Willerth SM, Arendas KJ, Gottlieb DI, Sakiyama-Elbert SE. Optimization of fibrin scaffolds for differentiation of murine embryonic stem cells into neural lineage cells. *Biomaterials* 2006; 27:5990-6003.

Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate to neurons. *Journal of Neuroscience Research* 2000; 61:264-370.

Wurmser AE, Gage FH. Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature* 2002; 416:485-487.

**X**

---

Xiong Y, Lu D, Qu C, Goussev A, Schallert T, Mahmood A, Chopp M. Effects of erythropoietin on reducing brain damage and improving functional outcome after traumatic brain injury in mice. *J Neurosurg* 2008; 109:510–521.

Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Emerging treatments for traumatic brain injury. *Expert Opin Emerg Drugs* 2009a; 14:67-84.

Xiong Y, Qu C, Mahmood A, Liu Z, Ning R, Li Y, Kaplan DL, Schallert T, Chopp M. Delayed transplantation of human marrow stromal cell-seeded scaffolds increases transcallosal neural fiber length, angiogenesis, and hippocampal neuronal survival and improves functional outcome after traumatic brain injury in rats. *Brain Res.* 2009b; 1263:183-91.

**Y**

---

Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, Ueda M. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg* 2003; 31:27-33.

Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416:545-548.

Yoo SW, Kim SS, Lee SY, Kim HS, Lee YD, Suh-Kim H. Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model. *Experimental and Molecular Medicine* 2008;40:387-397.

Yoshimura S, Teramoto T, Whalen MJ, Irizarry MC, Takagi Y, Qiu J, Harada J, Waeber C, Breakefield XO, Moskowitz MA. FGF-2 regulates neurogenesis and degeneration in the dentate gyrus after traumatic brain injury in mice. *J Clin Invest* 2003; 112:1202–10.

Yoshizaki T, Inaji M, Kouike H, Shimazaki T, Sawamoto K, Ando K, Date I, Kobayashi K, Suhara T, Uchiyama Y, Okano H. Isolation and transplantation of dopaminergic neurons generated from mouse embryonic stem cells. *Neurosciences Letters* 2004;363:33-37.

---

**Z**

---

Zhang C, Saatman K, Royo NC, Soltesz KM, Millard M, Schouten J, Motta M, Hoover RC, McMillan A, Watson DJ, Lee V M-Y, Trojanowski JQ, McIntosh TK. Delayed transplantation of human neurons following brain injury in rats: a long-term graft survival and behavior study. *J Neurotrauma* 2005; 22(12):1456–1474.

Zhang H, Huang Z, Xu Y, Zhang S. Differentiation and neurological benefit of the mesenchymal stem cells transplanted into the rat brain following intracerebral hemorrhage. *Neurological Research* 2006;28:104-112.

Zhang ZG, Chopp M. Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. *Lancet Neurol* 2009; 8: 491–500.

Zhang ZX, Guan LX, Zhang K, Zhang Q, Dai LJ. A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stromal cells to patients with traumatic brain injury. *Cytotherapy* 2008; 10:134–139.

Zhou Z, Chen H, Zhang K, Yang H, Liu J, Huang Q. Protective effect of nerve growth factor on neurons after traumatic brain injury. *Jo Bas Clin Physiol Pharmacol* 2003; 14:217-224.

Zurita M, Aguayo C, Oya S, Vaquero J. Implicación de factores neurotróficos en la transdiferenciación neuronal de células madre mesenquimales adultas. *Mapfre Medicina* 2007a; 18(3):201-208.

Zurita M, Bonilla C, Otero L, Aguayo C, Vaquero J. Neural transdifferentiation of bone marrow stromal cells obtained by chemical agents is a short-time reversible phenomenon. *Neuroscience Research*. 2008a; 60(3):275-280.

Zurita M, Otero L, Aguayo C, Bonilla C, Ferreira E, Parajon A, Vaquero J. Cell therapy for spinal cord repair: optimization of biologic scaffolds for survival and neural differentiation of human bone marrow stromal cells. *Cytotherapy* 2010; 12:522–537.

Zurita M, Vaquero J, Bonilla C, Santos M, De Haro J, Oya S, Aguayo C. Functional recovery of chronic paraplegic pigs after autologous transplantation of bone marrow stromal cells. *Transplantation* 2008b; 86:845-853.

Zurita M, Vaquero J, Oya S, Bonilla C, Aguayo C. Neurotrophic Schwann-cell factors induce neural differentiation of bone marrow stromal cells. *Neuroreport* 2007b; 18:1713-1717.

Zurita M, Vaquero J. Bone marrow stromal cells can achieve cure of chronic paraplegic rats: functional and morphological outcome one year after transplantation. *Neurosciences Letters* 2006; 402:51-56.